BIOCHEMISCHE UND THERMODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REAKTION ZWISCHEN DEM BACTERIOPHAGEN T5 UND SEINEM REZEPTOR AUS ESCHERICHIA COLI B

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Martin Brusdeilins

aus Hamburg

1982

BIOCHEMISCHE UND THERMODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR REAKTION ZWISCHEN DEM BACTERIOPHAGEN T5 UND SEINEM REZEPTOR AUS ESCHERICHIA COLI B

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Martin Brusdeilins

aus Hamburg

1982

Tag der mündlichen Prüfung	22. Oktober 1982
Dekan	Prof. Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter	Dr. CSc V. Zarybnicky
2. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Braun

UNIV. LEIDEN BIBL.

Ich danke Herrn Dr. CSc V. Zarybnicky für die Einführung in das Thema, die vielen Hilfestellungen und die stete Diskussionsbereitschaft.
Meiner Frau danke ich für die geduldige Durchsicht des Manuskripts.
Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Stipendium der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V. unterstützt.

Ein kleiner Teil dieser Arbeit ist mit der freundlichen Erlaubnis des damaligen Dekans Professor Dr. A. Hager in die, im Folgenden als (121) zitierte Veröffentlichung
V. Zarybnicky, M. Brusdeilins und M. Reich:
'Thermodynamic and kinetic studies of the interaction between T5-phages and their receptor, isolated from Escherichia coli B, in the absence and presence of Triton X-100'
Biophysical Journal 35 (1981) S. 615-636,
eingegangen. Es handelt sich hierbei im Einzelnen um Teile der Abschnitte 3.2.2, 3.2.4.1, 3.2.4.2 und 3.2.4.5.

Verwendete Abkürzungen

CMC	kritische Mizellen-Konzentration. Diejenige Konzentration einer Detergenslösung, bei deren Überschreiten das Detergens nicht mehr monomolekular, sondern in Form von Mizellen vorliegt.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure.
KA	kinetische Aktivität (s. S. 39).
KDO	3-Deoxyoctulosonsäure.
KSA	kinetische spezifische Aktivität (s. S. 39).
LPS	Lipopolysaccharid.
OmpC	Genprodukt des Gens ompC (Hauptprot. d. ä. Mem.).
OmpF	Genprodukt des Gens ompF (Hauptprot. d. ä. Mem.).
PFU	Plaques forming unit.
rpm	Umdrehungen pro Minute.
RU	Rezeptoreinheit, welche einen Phagen zu inaktivieren vermag.
SA	spezifische Aktivität (s. S. 38).
SDS	Natriumdodecylsulfat.
TMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin.
TonA	Genprodukt des Gens tonA (identische mit fhuA).
TonB	Genprodukt des Gens tonB.
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan.
Triton	Triton X-100 (p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy-polyethylenglycol (9.5 Ethylenglycol-Reste)).

Verwendete physikalische Konstanten

Avogadrosche Zahl	$N_A = 6.023 \cdot 10^{23}$	Partikel/Mol
Boltzmann-Konstante	$k = 1.3806 \cdot 10^{-23}$	$J \cdot K^{-1}$
Gaskonstante	$R = 8.3243$	$J \cdot K^{-1} \cdot Mol^{-1}$
Plancksche Konstante	$h = 6.6262 \cdot 10^{-34}$	J·sec

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	9
1.1	Bau der Zellhülle gram-negativer Bakterien	9
1.2	Bestandteile der äusseren Membran als Phagenrezeptoren	10
1.3	Das T5-Rezeptorprotein und seine funktionelle Umgebung	11
1.4	Kinetische Untersuchungen der Reaktion zwischen T5-Phagen und isolierten Rezeptoren in vitro - Aufgabenstellung -	12
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1	Vorbemerkungen	14
2.2	Kulturmedien und Lösungen	15
2.3	Bakterien und Phagen	16
2.4	Arbeitsvorschriften	17
2.4.1	Reinigung von Zellwandbestandteilen	17
2.4.1.1	Modifizierte Reinigung von 'Weidel'-Rezeptor	17
2.4.1.2	Pankreatinbehandlung von Rezeptorpräparationen	18
2.4.1.3	Isolierung von Lipopolysaccharid aus E. coli B	19
2.4.1.4	Isolierung von Phospholipiden aus E. coli	19
2.4.1.5	Reinigung der äusseren Membran von E. coli nach Osborn	19
2.4.2	Analytische Methoden	20
2.4.2.1	Protein-Bestimmung nach Lowry	20
2.4.2.2	Protein-Bestimmung mit Fluram	21
2.4.2.3	Lipopolysaccharid-Bestimmung über den KDO-Gehalt	22
2.4.2.4	Phospholipid-Bestimmung in Rezeptorpräparationen	23
2.4.2.5	Phosphat-Bestimmung nach Lowry	23
2.4.2.6	Triton-Bestimmung in Gegenwart von Protein	24

2.4.2.7	Triton-Bestimmung in Abwesenheit von Protein	24
2.4.2.8	Szintillationsmessung radioktiver Proben	24
2.4.2.9	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lugtenberg	25
2.4.2.10	Färben von Elektrophorese-Gelen	26
2.4.3	Analytische Ultrazentrifugation	27
2.4.3.1	Bestimmung von Svedberg-Sedimentations-konstanten	27
2.4.3.2	Bestimmung der Dichte von Rezeptorpartikeln mittels analytischer Ultrazentrifugation in D_2O	28
2.4.3.3	Berechnung des Partikel-Molekulargewichts aus Sedimentatonskonstante und Dichte	28
2.4.4	Kinetische Messungen	29
2.4.4.1	Bestimmung der PFU	29
2.4.4.2	Bestimmung der 'kinetischen Rezeptor-aktivität' (KA)	29
2.4.4.3	Bestimmung der 'kinetischen spezifischen Rezeptoraktivität' (KSA)	30
2.4.4.4	Bestimmung der 'spezifischen Rezeptor-aktivität' (SA)	30
2.4.4.5	Kinetische Messungen bei verschiedenen Temperaturen	31
2.4.5	Säulenchromatografische Methoden	31
2.4.5.1	Gelfiltration	31
2.4.5.2	Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen	32
2.4.5.3	DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie	33
2.4.6	Sonstiges	33
2.4.6.1	Cloud Point-Bestimmung	33
2.4.6.2	Ultrafiltration verdünnter Rezeptorlösungen	34
2.4.6.3	Phagentropftest	34
2.4.6.4	Protease-Versuche	34
2.5	Mathematische Methoden	36
2.5.1	Berechnung der kinetischen und thermody-namischen Parameter	36
2.5.2	Berechnung der theoretischen Abbildungen	37
2.5.3	Plot-Programme	37

3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Aktivität von Rezeptorpräparationen	38
3.2	Eigenschaften des Weidel-Rezeptors	41
3.2.1	Zusammensetzung des Weidel-Rezeptors	41
3.2.1.1	Lipopolysaccharid im Weidel-Rezeptor	44
3.2.2	Stabilität des Rezeptorkomplexes	45
3.2.3	Grösse des Weidel-Rezeptors	45
3.2.4	Verhalten des Weidel-Rezeptors in Triton-haltigen Puffern	47
3.2.4.1	Ionenstärke-Abhängigkeit der Triton-Spaltung	48
3.2.4.2	Zunahme der Rezeptoraktivität in Triton-Puffer	50
3.2.4.3	Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung	50
3.2.4.4	Abtrennung des Lipopolysaccharids	52
3.2.4.5	Temperaturabhängigkeit der Spaltung	54
3.2.5	Behandlung des Rezeptors mit Proteasen und Untersuchung der Aktivitätseigenschaften der hierbei erhaltenen Bruchstücke	57
3.3	Anreicherung des TonA-Proteins	60
3.3.1	Cloud Point	62
3.3.2	DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie von Weidel-Rezeptor bei erhöhter Temperatur	62
3.3.3	Eigenschaften der angereicherten TonA-Präparation	69
3.3.3.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität SA	69
3.3.3.2	Grösse der angereicherten TonA-Protein-haltigen Partikel	70
3.4	Thermodynamische Untersuchung der Reaktion von T5-Phagen mit der angereicherten TonA-Protein-Präparation	73
3.4.1	Kinetik der T5-Phageninaktivierung durch seinen Rezeptor	73
3.4.2	Thermodynamische Auswertung	79
3.4.3	Einfluss von Lipopolysaccharid	83

4.	DISKUSSION	87
4.1	Der Weidel-Rezeptor als Reaktionspartner des Phagen T5 - Ein in vitro-Modellsystem -	87
4.2	Der Weidel-Rezeptor in Triton X-100-haltigen Puffern	89
4.3	Anreicherung von TonA-Protein	92
4.4	Eigenschaften der TonA-Präparation	92
4.5	Kinetik der Reaktion zwischen T5-Phagen und der angereicherten TonA-Präparation	94
4.6	Thermodynamik der Reaktion zwischen T5-Phagen und deren Rezeptor	99
4.6.1	Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	103
6.	LITERATUR	105
7.	LEBENSLAUF	117

1. EINLEITUNG

1.1 Bau der Zellhülle gram-negativer Bakterien

Die Zellhülle gram-negativer Bakterien ist aus drei Schichten aufgebaut. Zuinnerst liegt die cytoplasmatische Membran. Sie beherbergt die Systeme des aktiven Transports, der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. In ihr liegen weiterhin viele Enzyme der Synthese von Membranbestandteilen wie Phospholipiden, Lipopolysacchariden und dem Murein. Letzteres umschliesst als zweite Schicht die Cytoplasmamembran in Form eines einschichtigen, monomolekularen Sacculus, aufgebaut aus, durch Peptidbrücken quervernetzten Polysaccharidsträngen aus, ß(1-4)-verknüpften N-Acetylmuraminsäure-N-Acetylglucosamin-Disacchariden. Die Mureinschicht gibt der Zelle mechanische und osmotische Stabilität.
Ihr unmittelbar aufgelagert liegt die äussere Membran. Sie schliesst die Zelle nach aussen ab und ist wie die innere Membran aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen aufgebaut. In ihr findet man auch, als dem einzigen Ort der Bakterienzelle, das Lipopolysaccharid. Es ist ausschliesslich auf der Aussenseite der äusseren Membran angeordnet (63, 64), während das Phospholipid anscheinend nur in der inneren Schicht vorkommt (27, 71, 109). Die äussere Membran besteht zu ungefähr 50 % aus Protein (25). Hiervon entfällt der allergrösste Teil auf, je nach Bakterienstamm, ungefähr 5 Proteinspecies, die sogenannten ´major outer membrane proteins´. Diese haben Strukturerhaltende Funktionen, bilden Diffusionsporen für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 600 D (67), sind an der Konjugation der Bakterien beteiligt (94) und dienen der festen Verbindung zwischen der äusseren Membran und dem Murein. Letztere erfolgt über das Lipoprotein sogar kovalent (12). Neben diesen Hauptproteinen der äusseren Membran kommen ungefähr 40 weitere Proteine vor, die unter anderem die Aufnahme spezieller Verbindungen wie Nucleosiden, Maltodextrinen oder Siderophoren vermitteln. Übersichten zur Struktur und Funktion der äusseren Membran finden sich in (7, 9, 10, 25, 74).

1.2 Bestandteile der äusseren Membran als Phagenrezeptoren

Für alle von aussen am Bakterium zugänglichen Strukturen wurden im Laufe der Zeit Phagen gefunden, die sich ihrer als Rezeptor bedienen. So reagieren z.B. die Phagen T3, T4 und T7 mit dem Lipopolysaccharid und die Phagen T1, T2, T5, T6, TuIa, TuIb, λ, Φ80 und viele andere mit verschiedenen Proteinen der äusseren Membran (siehe z.B. (9)). Auch Phagen, die Proteine der F-Pili als Rezeptor verwenden oder solche, die zunächst an Kapselpolysaccharide binden, wurden gefunden. Die von Bradley (6) getroffene morphologische Einteilung der Bacteriophagen in solche mit langem, von einer kontraktilen Scheide umhülltem Schwanz (Typ A), mit langem, flexiblem Schwanz (Typ B) oder mit kurzem Schwanzstummel (Typ C), ermöglicht keine Vorhersage über die bevorzugte Rezeptorsubstanz. So sind die LPS-Phagen T3 und T7 dem Typ C zuzuordnen, während T4 zum Typ A gehört. Andersherum reagieren Typ A-Phagen sowohl mit LPS, mit Proteinen oder mit Kapselpolysacchariden. Die Verhältnisse werden noch dadurch kompliziert, dass verschiedene Komponenten des Phagenschwanzes, wie bei T5 die Schwanzfasern mit LPS und die Schwanzspitze mit dem TonA-Protein (43), mit unterschiedlichen Partnern an der Membran reagieren.

Die Adsorption eines Phagen an die Bakterienoberfläche scheint in vielen Fällen nur dann zu einer wirksamen Infektion zu führen, wenn sie im Bereich der Adhäsionszonen zwischen innerer und äusserer Membran erfolgt (3). Dorthin müssten die Phagen entweder irreversibel adsorbiert, indem das Rezeptorprotein lateral in der Membran diffundiert, oder durch Diffusion an der Bakterienoberfläche, begünstigt durch immer wieder erfolgende, reversible Adsorption, gelangen (115). Solche zunächst reversibel erfolgenden Adsorptionen wurden für viele Phagen gefunden (z.B. T1 (18), T2 (82), T4 (101), T5 (43, 120), ε_{15} (115)) und für λ und T5 auch an isolierten Rezeptoren in vitro untersucht (91, 120, 121).

1.3 Das T5-Rezeptorprotein und seine funktionelle Umgebung

Als Rezeptorprotein für die irreversible Bindung des Phagen T5 an die äussere Bakterienmembran wurde das Produkt des Gens tonA identifiziert (11, 13). Neben T5 benützen auch die Phagen T1 und Φ80 dieses Protein als Rezeptor. Ferner dient es der Aufnahme des Colicins M, der Eisentransportverbindung Ferrichrom und des Antibiotikums Albomycin, welches dem Ferrichrom in der Struktur ähnelt. Solche multifunktionellen Rezeptoren in der äusseren Membran sind keine Ausnahme, sondern wohl eher die Regel. Abbildung 1 gibt einige Beispiele. Die Bindestellen für die verschie-

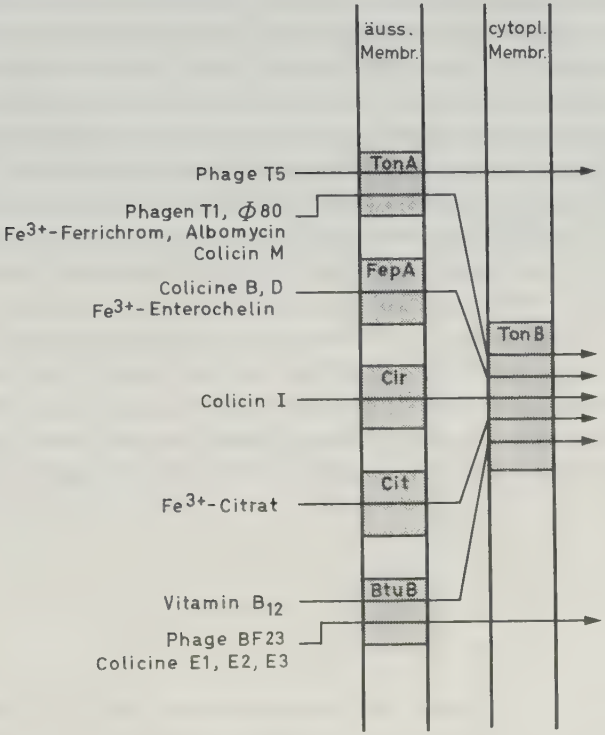

ABBILDUNG 1: Das tonB-System.
(Entnommen aus (7); die Symbole der Genprodukte wurden entsprechend (9) dem neueren Gebrauch angepasst).

denen Substrate scheinen auf dem Rezeptorprotein sehr nahe beieinander zu liegen, sich sogar weitgehend zu überlappen (39, 50). Inwieweit das TonA-Protein eine Pore darstellt, welche sowohl die niedermolekularen Substrate als auch die DNS der Phagen durch die äussere Membran treten lässt, ist unbekannt. Mit 78 000 D würde die Grösse des Proteins diese Funktion zulassen. Genetische Untersuchungen haben für den kompletten Aufnahmevorgang der Substrate verschiedener Rezeptorproteine komplizierte, wechselseitige Abhängigkeiten aufgedeckt. In dem in Abbildung 1 beschriebenen System, zu dem auch das TonA-Protein gehört, vermittelt das Produkt des Gens tonB die energieabhängige Verwertung einiger, aber nicht aller, der an die äusseren Membranrezeptoren gebundenen Substrate. Das tonB-Genprodukt wurde als Protein der inneren Membran identifiziert (78). Seine Funktion ist sicher nicht die einer Permease für all diese Substanzen. Es scheint vielmehr eine Koppelung zwischen dem energetisierten Zustand der Cytoplasmamembran und der äusseren Membran zu vermitteln (38, 39). Wie Kompetitionsexperimente zwischen T5 und Ferrichrom in $tonB^-$- und hungernden Zellen nahelegen, könnte es hierdurch beim TonA-Protein zu einer Konformationsänderung kommen (39). Im energetisierten $tonB^+$-Zustand soll die Bindestelle für Ferrichrom so gestaltet sein, dass Ferrichrom-Bindung die Infektion mit T5 nicht verhindern kann wie dies im nicht-energetisierten Zustand möglich ist. Die Bindung von T5 an das TonA-Protein bleibt davon unbeeinflusst. Die Phagen T1 und Φ80, welche ebenfalls die energieabhängige tonB-Funktion benötigen, binden an hungernde und $tonB^-$-Zellen nur reversibel (38).

1.4 Kinetische Untersuchungen der Reaktion zwischen T5-Phagen und isolierten Rezeptoren in vitro
- Aufgabenstellung -

Kinetische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Phagen und isolierten Rezeptoren können, ergänzend zu den oben angedeuteten komplizierten Vorgängen bei der Phageninfektion am Bakterium, der Beschreibung der Vorgänge am Phagenschwanz dienen. Die Reaktion des Phagen mit dem Rezeptor wird in vielen Fällen als ein

mehrstufiger Prozess beschrieben (s.o.), der zunächst mit einem reversiblen Schritt beginnt. Daran anschliessend kommt es zur irreversiblen Bindung und zur Öffnung des Phagenschwanzes, welche die Ejektion der DNS einleitet. Die kinetische Analyse der Reaktion ermöglicht die Bestimmung sowohl der Geschwindigkeitskonstanten des reversiblen, als auch des irreversiblen Inaktivierungsschrittes. Dies ist insbesondere bei Phagen wie T5, bei denen sich der reversible Schritt nicht durch einfache Operationen wie Hunger oder tonB-Verlust vom irreversiblen abkoppeln lässt, die einzige Möglichkeit zu einer exakten Beschreibung des Verhaltens. Weiterhin ermöglichen kinetische Untersuchungen mit Rezeptorpartikeln unterschiedlicher Zusammensetzung Aussagen darüber, ob nur einer oder ob mehrere Bausteine der Membran an der Reaktion beteiligt, und wieviele Bausteine der gleichen Sorte für die Inaktivierung eines Phagens notwendig sind. Hierzu werden möglichst genaue Informationen über Grösse und Zusammensetzung der Rezeptorpartikel benötigt. Deshalb wird im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der für unsere Untersuchungen als Referenz dienende sogenannte Weidel-Rezeptor und sein Verhalten in Medien mit und ohne Triton X-100, welche für kinetische Untersuchungen benützt wurden (121), beschrieben. Da für thermodynamische Analysen Kinetiken bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen werden müssen, wurde jeweils auch auf das Temperaturverhalten des Systems Wert gelegt. Der zweite Teil beschreibt die Anreicherung einer TonA-Präparation und deren Eigenschaften. Im dritten Teil folgt dann die kinetische und thermodynamische Analyse der Reaktion dieser TonA-Präparation mit dem Phagen T5.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Vorbemerkungen

Die Chemikalienlieferanten sind in der Regel nur dort angegeben, wo es besonders auf die Reinheit der Chemikalien ankommt und wo unterschiedliche Präparationsmethoden zu verschiedenartigen Verunreinigungen geführt haben könnten. Die gängigen Lösungsmittel sind von Merck (Darmstadt) in den angegebenen Reinheitsgraden. Unter der Angabe ´Wasser´ ist hier immer durch Autoklavieren sterilisiertes, bidestilliertes Wasser zu verstehen. Alle Puffer und Lösungen wurden ebenfalls durch Autoklavieren (119 °C, 20 min) sterilisiert.

Zur Bezeichnung von präparativen Zentrifugationen wurde folgende Kennzeichnung gewählt: (Zentrifugentyp, verwendeter Rotor, Lauftemperatur, Laufzeit mit Anlauf, ohne Auslauf, Drehzahl (rpm), mittleres Vielfaches der Erdbeschleunigung). Hierbei steht als Zentrifugentyp ´Sorvall´ stellvertretend für eine Sorvall Kühlzentrifuge Superspeed RC2-B und ´Beckman´ für eine Beckman Ultrazentrifuge L2 65 B.

Alle im Text erscheinenden Phosphat-Puffer sind aus Di-Natriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat hergestellt.

Um Fehler in der Salzkonzentration zu vermeiden, sind alle Medien, deren pH eingestellt wird, möglichst aus den freien Säuren bzw. freien Basen hergestellt und erst nach dem Mischen aller Komponenten titriert worden. Dies ist besonders bei EDTA-haltigen Lösungen wichtig.

2.2 Kulturmedien und Lösungen

G-Lösung (Medium zum Verdünnen und Aufbewahren von Phagen)

10	mMol/l	Tris-HCl pH 7.3
100	mMol/l	Natriumchlorid
0.1	g/l	Gelatine
1	mMol/l	Calciumchlorid
1	mMol/l	Magnesiumchlorid.

S-Lösung (Medium zum Verdünnen und Waschen von Bakterien)

10	mMol/l	Tris-HCl pH 7.3
100	mMol/l	Natriumchlorid.

NB-Lösung (Vollmedium für Bakterienzucht)

5	g/l	Bacto-Trypton (Difco Laboratories)
100	mMol/l	Natriumchlorid
1	mMol/l	Calciumchlorid
1	mMol/l	Magnesiumchlorid
		mit 1 Mol/l HCl auf pH 7.3 eingestellt.

Synthetisches Medium für Bakterienzucht

Lösung A: 75	g	Natriumchlorid
50	g	Ammoniumchlorid
6	g	Magnesiumsulfat · 7 H_2O
3	g	Calciumchlorid · 2 H_2O
5	g	Asparaginsäure
5	g	Glutaminsäure
		auf 20 l deion. Wasser. Für die Herstellung proteinmarkierter Bakterien wurden die zwei Aminosäuren weggelassen.
Lösung B: 800	g	Natriumlactat-Lösung, rein, etwa 50 % (Merck)
170	g	Glycerin, wasserfrei, reinst (Merck)
		auf 10 l deion. Wasser.
Lösung C: 75	g	Kaliumhydrogenphosphat
362.5	g	Di-Natriumhydrogenphosphat · 2 H_2O
		auf 10 l deion. Wasser. Unmittelbar vor Verwendung wurden die drei Lösungen zusammengegeben. Der pH beträgt etwa 7.4.

Hartagar zum Plattieren von Bakterien

5 g Natriumchlorid
10 g Bacto-Trypton (Difco Laboratories)
15 g Bacto-Agar (Difco Laboratories)
1 ml 1 Mol/l Magnesiumchlorid
1 ml 1 Mol/l Calciumchlorid
auf 1 l Leitungswasser. Mit 1 Mol/l NaOH auf pH 7.4 eingestellt. Je Petri-Schale wurden 20 ml verwendet.

Weichagar für die Phagentiter-Bestimmung
wie Hartagar, jedoch mit nur 4.4 g/l Bacto-Agar.

2.3 Bakterien und Phagen

Sowohl für die Rezeptorpräparation als auch als Indikator-Bakterium für die Phagentitration wurde ein Wildstamm von Escherichia coli B verwandt. Er stammt ursprünglich aus der Sammlung von Dr. Kellenberger (Basel, Schweiz) und wird seit über zehn Jahren in unserem Labor weitergezüchtet. Die Generationszeit bei 37 °C beträgt in NB-Lösung 20 min, in synthetischem Medium ungefähr 40 min. Die Zusammensetzung und das Substitutionsmuster seines Lipopolysaccharids sind identisch mit dem von Prehm et al. (81) für deren Stamm E. coli B 2499 gefundenen (15).
Für Präparationen verwendete Bakterien wurden im Phagentropftest (2.4.6.3) routinemässig auf ihre Empfindlichkeit gegen die Phagen T4D, T4D-os, T4D-IP_o und T5st geprüft. Der auch für die kinetischen Versuche verwendete Stamm T5st entstammt der Sammlung des verstorbenen Dr. Weidel. Er trägt keine Tailfibers. Die verwendeten Phagen wurden entsprechend (122) durch Zentrifugation im CsCl-Gradienten gereinigt.

2.4 Arbeitsvorschriften

2.4.1 Reinigung von Zellwandbestandteilen

2.4.1.1 Modifizierte Reinigung von 'Weidel'-Rezeptor (113, 13, 121)

Bis zu 40 l gut belüfteter E. coli B-Kultur in synthetischem Medium wurden mit einem Durchflussrotor geerntet (1 bar Pressluft, sterilisiert mittels 50 mm-Sartorius-Membranfilter SM 11 309, entsprechend etwa 1 m^3/h (88); ungefähr $7 \cdot 10^8$ Bakterien/ml zu Beginn der Ernte; Sorvall SS34 mit Zusatz-System KSB-R, Sorvall "Szent-Gyorgyi und Blum"-Durchflusssystem, 10 l/h). Hierbei wurde die Kultur durch Zusatz von Eis zum Wasserbad von der Zuchttemperatur 37 °C auf ungefähr 10 °C heruntergekühlt. Die Bakterien wurden einmal in S-Lösung gewaschen und dann abzentrifugiert (Sorvall, GSA, 4 °C, 20 min, 11 000 rpm, 15 000·g). Anschliessend wurde zweimal bei Raumtemperatur extrahiert. Hierzu wurden die Bakterien in bidestilliertem Wasser resuspendiert (5 ml/g Feuchtgewicht) und tropfenweise (Dauer etwa 15 min) mit 2.5 ml/g 0.1 N Natronlauge versetzt. Sofort anschliessend wurde die, durch austretende DNS, zäh gewordene Suspension durch kräftiges Aufblasen von CO_2 unter kräftigem Rühren neutralisiert (pH-Elektrode bis pH 7.4) und, mit einer Spatelspitze DNase versetzt, noch 5 min weitergerührt. Es ist zweckmässig, nicht mehr als 50 g Bakterien auf einmal zu extrahieren, da andernfalls der Neutralisations-Vorgang zu lange dauert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall, GSA, 4 °C, 30 min, 8 000 rpm, 10 000·g). Zur Abtrennung von verbliebenen, groben Membranresten wurden die vereinigten Überstände der beiden Extraktionen nochmals langsam wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Rezeptor aus dem Überstand geerntet (Sorvall, GSA, 4 °C, 24 h, 10 000 rpm, 16 000·g). Hieran schloss sich eine Gelchromatografie an Bio-Gel A-50m (100 - 200 mesh) in 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0 mit 0.05 % NaN_3 (13). Verwendet wurde eine 2.6·90 cm-Säule bei 15 °C mit 15 ml/h und 90 Tropfen/Fraktion, entsprechend ungefähr 5 ml. Zum Auftragen wurde der Rezeptor in

Säulenpuffer gelöst, 5 min mit Ultraschall behandelt (Di-Son-Tegrator System Thirty, Model G 30 C2) und gegebenenfalls von Ungelöstem durch Zentrifugation abgetrennt (Sorvall, SS34, 4 °C, 6 min, 10 000 rpm, 12 000·g). Es wurden drei Peaks eluiert. Der erste, im Ausschlussvolumen, enthält Membranfragmente, der zweite den gereinigten Weidel-Rezeptor und der dritte niedermolekulare Bruchstücke. Falls der erste und der zweite Peak zu sehr überlappten, musste der Rezeptor ein zweites Mal aufgetragen werden. Die vereinigten Fraktionen wurden zur Ernte zentrifugiert (Beckman, Type 35, 4 °C, 50 h, 30 000 rpm, 100 000·g) und das Pellet, je nach Weiterverwendung, in 0.05 % NaN_3 oder einem anderen Lösungsmittel aufgenommen.

Radioaktiv markierte Rezeptoren wurden in der Regel aus 5 l Kultur gewonnen, der bei einem Titer von ungefähr $2 \cdot 10^6$ Bakterien/ml 0.05 mCi [U-^{14}C]-Proteinhydrolysat (Amersham Buchler, Braunschweig) und, für den Fall, dass auch LPS markiert werden sollte, 0.1 mCi D-[6-^{3}H]-Glucose zugesetzt wurde. Hierbei waren die erreichten spezifischen Aktivitäten $1.8 \cdot 10^5$ cpm ^{14}C/mg Protein und $1.6 \cdot 10^4$ cpm ^{3}H/mg LPS. Kontamination des Proteins mit Tritium und des LPS mit ^{14}C waren unterhalb der Erfassungsgrenze.

2.4.1.2 Pankreatin-Behandlung von Rezeptorpräparationen (113)

5 ml Rezeptor-Lösung (15 mg/ml, vor Bio-Gel-Reinigung) in 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0 mit 0.05 % NaN_3 wurden im Dialysierschlauch mit 1 ml Pankreatin (Merck, 10 mg/ml, vom Ungelösten durch Zentrifugation befreit) versetzt und drei Tage bei 4°C gegen Puffer dialysiert. Hierbei wurde nach jeweils 24 h erneut ein Milliliter Pankreatin-Lösung zugegeben. Nach weiteren drei Tagen Dialyse gegen frischen Puffer wurde die Probe zentrifugiert (Sorvall, SS34, 4 °C, 1 h, 10 000 rpm, 12 000·g). Die freigesetzten Fettsäuren steigen an die Oberfläche und können abgehoben werden. Etwaig entstehendes Pellet wurde verworfen.

2.4.1.3 Isolierung von Lipopolysaccharid aus E. coli B

Die Reinigung folgt exakt dem von Galanos et al. (32) beschriebenen Phenol-Chloroform-Petrolether-Verfahren (PCP). Sie wurde auch auf die, nach der T5-Rezeptor-Extraktion übrigbleibenden, E. coli-Reste mit gutem Erfolg angewandt.

2.4.1.4 Isolierung von Phospholipiden aus E. coli (107)

45 g Bakterien wurden in 400 ml Chloroform/Methanol (1:2) gut suspendiert und 15 min im Eisbad gerührt. Anschliessend wurden 128 ml Chloroform und 200 ml Wasser hinzugegeben und weitere 15 min im Eis gerührt. Die Zellreste wurden abzentrifugiert (Sorvall, GSA, 10 000 rpm, 4 °C, 10 min), und die zwei Phasen im Scheidetrichter voneinander getrennt. Die Chloroformphase wurde am Rotationsverdampfer einrotiert, wobei das Wasserbad höchstens auf 10 °C erwärmt wurde. Das Lipid wurde bei -20 °C unter Stickstoff aufbewahrt.

2.4.1.5 Reinigung der äusseren Membran von E. coli nach Osborn (73)

Die Bakterien von 3 l Kultur in NB-Lösung wurden durch 10minütige Zentrifugation im Sorvall GSA-Rotor bei 10 000 rpm und 4 °C geerntet und einmal in 50 - 60 ml 0.85 % NaCl-Lösung gewaschen (Sorvall, SS34, 4 °C, 10 000 rpm, 10 min). Anschliessend wurden die Zellen in 0.75 Mol/l Saccharose, 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8 resuspendiert (10 ml/g Bakterien). Im Eisbad kam unter Rühren eine Lösung von 10 mg/ml Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 0.2 mg/ml hinzu. Nach 2 min wurde die Reaktion durch Zugabe vom zweifachen Volumen 1.5 mMol/l EDTA pH 7.5 gestoppt und, bis fast alle Zellen zu Sphäroplasten umgewandelt worden waren (Mikroskop), zunächst im Eisbad und anschliessend noch 15 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Zuletzt wurden die Sphäroplasten unter Eiskühlung 2 min mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, 1/2''-Arbeitsspitze

(flach)). Zu grosse Partikel wurden durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 4 °C, 3 000 rpm, 20 min) abgetrennt und verworfen. Die Membranfragmente wurden abzentrifugiert (Beckman, Type35, 4 °C, 30 000 rpm, 100 000·g, 4 h), das Sediment wurde einmal in 20 ml kalter Saccharose-Tris-EDTA-Lösung (Konzentration wie oben) aufgenommen und abermals zentrifugiert. Für den folgenden Saccharose-Gradienten wurde das Pellet in insgesamt 6 ml kalter 25 % (w/v) Saccharose in 5 mMol/l EDTA pH 7.5 aufgenommen. Die Gradienten wurden im Kühlraum in Cellulose-Nitrat-Röhrchen für den Beckman-Rotor SW 41 wie folgt geschichtet (alle Lösungen enthielten 5 mMol/l EDTA pH 7.5): Über ein Polster von 0.5 ml 55 %iger Saccharose-Lösung wurden fünfmal 2.1 ml Saccharose-Lösung mit 50, 45, 40, 35 und 30 % geschichtet. Hierauf kamen 0.9 bis 1 ml der obigen Probe in 25 %iger Saccharose-Lösung. Zentrifugiert wurde 19 - 24 h bei 4 °C und 36 000 rpm im SW41-Rotor. Erhalten werden vier Banden, die von oben nach unten 1. Plasmamembran (grünlich), 2. ebenfalls Plasmamembran (bei E. coli B sehr wenig), 3. ein Gemisch aus ungetrennter Plasma- und äusserer Membran und 4. äussere Membran (ganz weiss) enthalten. Die Banden wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt, auf ungefähr das vierfache Volumen mit 20 mMol/l Tris-HCl pH 7.5 verdünnt und abzentrifugiert (Beckman, Type35, 4 °C, 30 000 rpm, 4 h). Zuletzt wurde zweimal in 10 ml 20 mMol/l Tris-HCl pH 7.5 gewaschen (Beckman, Type35, 4 °C, 30 000 rpm, 20 min).

2.4.2 Analytische Methoden

2.4.2.1 Protein-Bestimmung nach Lowry (54)

Lösung A: 5.4 % Natriumcarbonat · 10 H_2O
in 0.1 Mol/l Natronlauge.

Lösung B: 1 % Natriumcitrat · 5.5 H_2O + 0.5 % Kupfersulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) in Wasser.

Lösung C: 50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B, frisch angesetzt.

Lösung D: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, 1:2 mit H_2O verdünnt.

Test: Zu 1 ml Lösung C wurden 0.1 ml Probe mit weniger als 0.1 mg Protein gegeben. Nach 10 - 20 min bei Raumtemperatur kamen hierzu unter heftigem Mischen 0.1 ml Lösung D. Nach weiteren 60 min bei 30 °C wurde die Extinktion bei 691 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.
Die Lowry-Protein-Bestimmung wird durch Anwesenheit von Triton X-100 erheblich gestört (76, 31, 40, 121). Während der Farbentwicklung bildet sich ein gut sedimentierender Niederschlag, der leicht abzentrifugiert werden kann. Der Test bleibt bei z. B. 0.3 % Triton linear bis 0.05 mg Protein. Der Leerwert steigt allerdings um ungefähr 0.1 Extinktionseinheiten/cm, sodass den Proben der Eichkurve ebenfalls Triton zugesetzt werden muss.

2.4.2.2 Protein-Bestimmung mit Fluram (108)

Weniger als 0.1 ml Probe mit weniger als 0.02 mg Protein wurden mit 0.1 Mol/l di-Natriumtetraborat ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) auf 1.5 ml aufgefüllt. Hierzu kam unter heftigem Schütteln auf einem Vortex 0.5 ml einer Lösung von 0.3 mg/ml Fluram (Fluorescamin; 4-Phenylspiro[furan-2(3H,1-phtalan]-3,3´-dion) p.a. (Serva) in getrocknetem Dioxan. Das Dioxan p.a. getrocknet von Merck kann direkt verwendet werden, älteres Dioxan sollte mittels Natriumdraht getrocknet und anschliessend destilliert werden. Die Aufbewahrung des Dioxans über keramischen Molekularsieben, wie zum Beispiel dem Merck Molekularsieb 5 Angström, ist nicht zu empfehlen, da sich das Dioxan hierbei mit der Zeit trübt und der Fluoreszenz-Untergrund erheblich zunimmt. Gemessen wurde die Fluoreszenz bei 480 nm (Monochromator), angeregt mit 365 nm (Filter) in einem Zeiss PMQ2-Spektralphotometer mit einem Fluoreszenz-Zusatz ZMF4 und einer Quecksilberlampe.
Die Empfindlichkeit lässt sich mittels des Gesamtvolumens in der Küvette und der Breite des Emissionsspaltes variieren. Gemessen wurde bei einer Spaltbreite von 0.47 mm.
Ein mg Triton auf 2 ml Probe ist tolerierbar; es erhöht jedoch die Fluoreszenzausbeute und muss auch den Proben der Eichkurve zugesetzt werden. Bei zu hoher Intensität des anregenden Lichtes

wird der fluoreszierende Farbstoff zerstört; der Messwert sollte deshalb schnell abgelesen werden.

2.4.2.3 Lipopolysaccharid-Bestimmung über den KDO-Gehalt (48)

Lösung 1: 0.8 Mol/l Schwefelsäure p.a..
Lösung 2: 0.04 Mol/l Perjodsäure in 0.25 Mol/l Schwefelsäure.
Lösung 3: 2.6 % Natrium-meta-arsenit in 0.5 Mol/l Salzsäure.
Lösung 4: 0.6 % Thiobarbitursäure (0.71 g Thiobarbitursäure + 90 ml Wasser + 0.7 ml 1 Mol/l Natronlauge unter Erhitzen lösen und ad 100 ml mit Wasser auffüllen).

Test: 0.5 ml Probe mit weniger als 1 mg/ml LPS wurden mit 0.5 ml Lösung 1 20 min bei 100 °C hydrolysiert. Daran anschliessend wurde, bei Trübung durch abgespaltenes Lipid, 4 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge 3200 (15 000 rpm, 12 000·g) zentrifugiert und vom klaren Überstand 0.5 ml entnommen. Zu diesen 0.5 ml kamen 0.5 ml Lösung 2 zur Perjodat-Oxidation (20 min bei Raumtemperatur). Der Überschuss an Perjodsäure wurde durch Zusatz von 0.25 ml Lösung 3 zerstört. Nach Verschwinden der braunen Farbe des freien Jods (ungefähr 2 min) wurde zur Farbentwicklung 0.5 ml Lösung 4 zugegeben und 15 min auf 100 °C erhitzt. Die noch heisse Mischung wurde mit 1 ml Dimethylsulfoxid p.a. versetzt und die Extinktion bei 548 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Auch diese Bestimmung wird durch die Anwesenheit von Triton X-100 gestört. Es bildet sich nach der Zugabe des Arsenits ein rotbrauner Niederschlag, der aber, wie bei der Lowry-Protein-Bestimmung, durch zweiminütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf Tischzentrifuge 3200 abgetrennt werden kann. Die Bildung des Niederschlags hat, zumindest bis 0.3 % Triton in der Probe, keinen Einfluss auf die spezifische Farbentwicklung, sodass die Proben der Eichkurve kein Triton zu enthalten brauchen.

2.4.2.4 Phospholipid-Bestimmung in Rezeptor-Präparationen

Die Phospholipid-Bestimmung erfolgte über den Phosphatgehalt der Phospholipide. Gerechnet wurde mit einem Phosphatgehalt von 4.6 % für E. coli-Lipide, bestimmt aus der Analyse von isoliertem Phospholipid. Bei bekanntem Lipopolysaccharidgehalt kann für dieses bei E. coli B ein Phosphatgehalt von 4.5 % angesetzt werden (81, 15).

2.4.2.5 Phosphat-Bestimmung nach Lowry (55)

Veraschungsreagenz: 0.8 Mol/l Perchlorsäure in
5 Mol/l Schwefelsäure
(7.6 ml 60 % $HClO_4$ + 27.8 ml konz. H_2SO_4 p.a. ad 100 ml mit Wasser).

Farbreagenz: 10 ml 0.25 % Ammoniummolybdat in 0.1 Mol/l Natriumacetat (820.3 mg NaAc + 250 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{27}\cdot 4H_2O$ ad 100 ml mit Wasser)
+ 1 ml 10 % Ascorbinsäure
(Die Mischung muss unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. Sie ist im Eis ungefähr eine halbe Stunde haltbar).

Veraschung: 0.1 ml Probe mit weniger als 40 nMol Phosphat wurden mit 0.1 ml Veraschungsreagenz gut gemischt und für 2 h auf 95 °C zum Entfernen des Wassers erhitzt. Daran schloss sich die eigentliche Veraschung durch 2 stündiges Erhitzen auf 165 °C. Waren die Proben danach noch braun und nicht mehr nur schwach gelblich, so wurde noch 0.1 ml rauchende Salpetersäure hinzugefügt und noch eine weitere halbe Stunde auf 165 °C erhitzt.

Test: 1 ml des Farbreagenz wurde auf die Proben gegeben und kräftig gemischt. Nach 2 h Inkubation bei 36 °C wurde die Extinktion bei 820 nm (empfindlicher) oder bei 650 nm gemessen.

Die Proben der Eichkurve müssen in allen Schritten gleich wie die zu messenden behandelt werden.

2.4.2.6 Triton X-100-Bestimmung in Gegenwart von Protein (33)

Zu 0.3 ml Probe, welche 50 % Ethanol und weniger als 0.4 mg Triton X-100 enthielt, kamen 0.4 ml einer Lösung von 17.8 g Ammoniumthiocyanat (NH_4SCN) und 2.8 g Kobalt(II)-nitrat ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) in 100 ml Wasser. Diese Farblösung ist, in Polyethylen-Flaschen aufbewahrt, stabil. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde 1.5 ml 1,2-Dichlorethan zugesetzt und zum Ausschütteln des Farbstoffs 2 min heftig auf einem Vortex gemischt. Die Phasentrennung kann durch 2 min zentrifugieren beschleunigt werden. Dies ist jedoch nicht in allen Fällen notwendig. Gemessen wurde die Differenz der Extinktionen bei 622 nm und bei 687 nm, jeweils gegen einen Reagenzienleerwert.

2.4.2.7 Triton X-100-Bestimmung in Abwesenheit von Protein

Triton X-100 hat ein Absorptionsmaximum bei 276 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von ungefähr 1750 l/Mol·cm. Die Extinktion verläuft zumindest unterhalb der kritischen Mizellen-Konzentration linear, sodass im Bereich zwischen 0 und ungefähr 0.02 % Triton gute Bestimmungen möglich sind.

2.4.2.8 Szintillationsmessung radioaktiver Proben

Die radioaktiven Proben wurden mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, mit 9 ml Quickszint 402 Szintillationslösung (Zinsser) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Temperieren wurden die Proben mindestens 30 min vor dem Messen in die Zählkammer des Packard Tri-Carb Model 3320 Liquid Scintillation Spectrometer gestellt. Die verwendete Szintillator-Lösung verhält sich wie die in (118), (83) und (119) beschriebene (Zarybnicky, unveröffentlichte Ergebnisse).

2.4.2.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lugtenberg et al. (56)

Die Elektrophorese wurde in einem, ähnlich dem von Studier (102) beschriebenen, Gerät durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden Gele der Grösse 15·15·0.1 cm hergestellt.

Trenngel: 5.0 ml Stammlösung 1 (44.0 g Acrylamid (Serva), 0.8 g Bisacrylamid (Serva) ad 100 ml mit bidest. Wasser)
4.1 ml bidest. Wasser
10.0 ml Trenngel-Puffer (0.75 Mol/l Tris-HCl pH 8.8)
0.4 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
0.5 ml 1 % Ammoniumpersulfat (jeweils frisch)
0.04 ml N,N,N′,N′-Tetramethylethylendiamin (TMED).

Die Endkonzentrationen des Trenngels waren 11 % Acrylamid, 0.2 % Bisacrylamid, 0.375 Mol/l Tris, 0.2 % SDS, 0.025 % Ammoniumpersulfat und 0.2 % TMED.

Sammelgel: 0.625 ml Stammlösung 2 (30.0 g Acrylamid, 0.8 g Bisacrlylamid ad 100 ml mit bidest. Wasser)
2.288 ml bidest. Wasser
3.125 ml Sammelgel-Puffer (0.25 Mol/l Tris-HCl pH 6.8)
0.0625 ml 10 % Natriumdodecylsulfat
0.150 ml 1 % Ammoniumpersulfat (frisch)
0.0125 ml TMED.

Die Endkonzentrationen des Sammelgels waren 3 % Acrylamid, 0.08 % Bisacrylamid, 0.125 Mol/l Tris, 0.1 % SDS, 0.024 % Ammoniumpersulfat und 0.2 % TMED.

Die Komponenten der Gele wurden im Eisbad zusammengemischt und vor der Zugabe von Ammoniumpersulfat und TMED jeweils 10 min an der Wasserstrahlpumpe entgast. Die Polymerisation des Trenngels dauerte bei Raumtemperatur ungefähr 20 min, die des Sammelgels ungefähr 1 h. Bevor das Gemisch für das Sammelgel auf das fertige Trenngel gegeben werden kann, muss letzteres gut mit 0.2 % SDS abgespült werden. Der Kamm für die Probenauftragetaschen wurde so eingelegt, dass die Laufstrecke im Sammelgel ungefähr 1 cm betrug. Er wurde nach einer Stunde entfernt und das fertige

Gel, mit Elektrophorese-Puffer überschichtet, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.
Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese 5 min in der folgenden Mischung auf 100 °C erhitzt:

Auftragsgemisch: 0.025 ml Proben-Puffer (0.25 Mol/l Tris-HCl pH 6.8)
0.025 ml Bromphenolblau (0.01 % in 50 % Glycerin)
0.020 ml 10 % SDS
0.005 ml Mercaptoethanol
0.025 ml Proteinlösung.

Die Endkonzentrationen des Auftragsgemisches waren 0.0625 Mol/l Tris, 2 % SDS, 5 % Mercaptoethanol, 12.5 % Glycerin und 0.0025 % Bromphenolblau.
Der Elektroden-Puffer bestand aus:

0.025 Mol/l Tris
0.19 Mol/l Glycin
0.1 % (w/v) SDS.

Die Stromstärke wurde mit einer Pharmacia Stromquelle ECPS 2000/300 reguliert. Sie betrug, bis die Bromphenolblau-Bande die Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel erreichte, 15 mA. Danach wurde die Stromstärke, bei gleichzeitiger Begrenzung der Leistung auf weniger als 7.5 Watt, auf 30 mA erhöht.

2.4.2.10 Färben von Elektrophorese-Gelen (100)

Es wurde die Vorschrift von Stegemann verwendet (100).

Färbe-Stammlösung: 30 g Trichloressigsäure
800 ml Wasser
200 ml Methanol
70 ml Essigsäure (96 %).

Farbstofflösung: 1 % Coomassie Brillant Blue R-150 in H_2O.

Die Gele wurden unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese in 200 ml der obigen Stammlösung, versetzt mit 5 ml Farbstofflösung, je eine Stunde pro Millimeter Geldicke gefärbt. Da SDS mit dem Farbstoff um die Bindestellen konkurriert, sollten SDS-hal-

tige Gele zuvor 2 bis 3 Stunden in Stammlösung ohne Farbstoff eingelegt und anschliessend über Nacht in frischer Lösung gefärbt werden.
Entfärbt wurde in einer Lösung aus 240 ml Methanol, 560 ml Wasser und 40 ml Essigsäure (96 %). Bei vier- bis fünfmaligem Wechseln des Entfärbers sind die 1 mm-Gele in ungefähr 4 Stunden entfärbt. Der Entfärber kann, nachdem er seinerseits mittels Aktivkohle entfärbt wurde, mehrfach wiederverwendet werden (5). Granulierte Aktivkohle wirkt hier wesentlich schlechter als staubförmige.

2.4.3 Analytische Ultrazentrifugation

2.4.3.1 Bestimmung von Svedberg-Sedimentationskonstanten in der analytischen Ultrazentrifuge

Gemessen wurde in einer, mit UV-Optik ausgestatteten, analytischen Ultrazentrifuge vom Typ MSE Centriscan 75. Die Sedimentationskonstante entspricht der mittels linearer Regression erhaltenen Steigung der Geraden, wenn man
$\ln [(R_{ref} + R)/(R_{ref} + R_0)]$ gegen $(t - t_0)/(\omega^2 \cdot 10^{-13})$ mit $R_{ref}=D_{ref} \cdot r_{ref}/d_{ref}$ aufträgt. Hierbei ist $r_{ref}=57$ mm der Abstand des oberen Referenzpunktes von der Rotorachse, $d_{ref}=16$ mm der Abstand zwischen oberem und unterem Referenzpunkt, D_{ref} letzterer Abstand, wie er auf dem Scan abgebildet wird, R_0 der Abstand zwischen oberem Referenzpunkt und dem Wendepunkt der Sedimentationsfront zur Zeit t_0, das heisst, wenn die gewünschte Drehzahl erreicht ist, R der Abstand vom oberen Referenzpunkt zum Wendepunkt der Sedimentationsfront zur Zeit t und ω die Winkelgeschwindigkeit.

2.4.3.2 Bestimmung der Dichte von Rezeptorpartikeln mittels analytischer Ultrazentrifugation in D_2O

Aus den Svedberg-Sedimentationskonstanten eines Partikels in zwei Medien (Index 1 und 2) unterschiedlicher Dichte lässt sich die Partikeldichte nach folgender Formel berechnen:

$$\rho_{Part} = \frac{\frac{s_1 \cdot \eta_1}{s_2 \cdot \eta_2} \cdot \rho_2 - \rho_1}{\frac{s_1 \cdot \eta_1}{s_2 \cdot \eta_2} - 1}$$

Gemessen wurde in Wasser (ρ_1=1.000 g/cm^3) und 90 % D_2O (ρ_2=1.096 g/cm^3). Der Unterschied in der Viskosität η ist vernachlässigbar.

2.4.3.3 Berechnung des Partikel-Molekulargewichts aus Sedimentationskonstante und Dichte

Das Molekulargewicht eines Partikels berechnet sich näherungsweise aus

$$M = \left[\frac{s \cdot \rho_{Lsg}}{Z \cdot (\rho_{Part} - \rho_{Lsg})} \right]^{3/2}$$

worin s die Sedimentationskonstante, ρ_{Part} die Teilchen-Dichte, ρ_{Lsg} die Dichte der Lösung (hier 1.00 g/cm^3) und Z eine empirisch ermittelte Konstante ist, die für hydratisierte, globuläre Proteine den Wert $9.2 \cdot 10^3$ hat.

2.4.4 Kinetische Messungen

2.4.4.1 Bestimmung der PFU

0.1 ml einer Phagenverdünnung, hergestellt in G-Lösung, wurden zu 5 ml Weichagar von 46 °C mit 0.5 ml Bakterien in NB-Lösung gegeben und in 94 mm-Petrischalen gegossen. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert (120, 121).Bei Proben, die nicht verdünnt werden müssen, wie z. B. bei der kinetischen Aktivitäts-Bestimmung, und die 0.3 % Triton X-100 enthalten, können die Platten nicht über Kopf inkubiert werden, da sich sonst der Agar aus den Platten löst.

2.4.4.2 Bestimmung der 'kinetischen Rezeptor-Aktivität' (KA)

0.005 bis 0.05 ml Probe (z. B. aus Säulenchromatografien) wurden mit 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l Natriumchlorid, 0.3 % Triton X-100 auf 0.4 ml aufgefüllt. Nach einer Vorinkubation von einer Stunde bei 36 °C kamen hierzu 0.1 ml einer T5-Phagensuspension in demselben Puffer mit einem Titer von $1.5 \cdot 10^4$ PFU/ml. Je nach Aktivität der Proben wurden hiervon nach 0.75 bis 24 h bei 36 °C je dreimal 0.1 ml direkt ausplattiert. Diese Methode diente nur der vergleichenden Aktivitätsbestimmung; zu vergleichende Proben müssen gleichlang inkubiert werden. Die abschätzende Berechnung der Aktivität geschah, unter der Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung, nach der Formel $KA = k_1 \cdot r_o = -t^{-1} \cdot \ln(p/p_o)$ wobei k_1 die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion, r_o die als zeitlich konstant angesehene Rezeptor-Konzentration, t die Zeit in Stunden, p der Mittelwert der Zahl der überlebenden PFU auf den drei Platten und p_o der entsprechende Mittelwert einer Kontrollreihe ohne Rezeptoraktivität ist.

2.4.4.3 Bestimmung der 'kinetischen spezifischen Rezeptoraktivität' (KSA)

Dividiert man obige 'kinetische Rezeptoraktivität' KA durch die im Test anwesende Proteinkonzentration, so erhält man die 'kinetische spezifische Aktivität' KSA. Aus Gründen der Zweckmässigkeit wurde bei den Säulenläufen meist die mittels der Fluram-Methode (2.4.2.2) ermittelte Proteinkonzentration verwendet.

2.4.4.4 Bestimmung der 'spezifischen Rezeptoraktivität' (SA) - Weidel'sche Abzählmethode (113, 120) -

Der Test titriert Rezeptorpartikel, im Folgenden RU (Receptor Units) genannt, mittels T5-Phagen. Hierzu ist eine recht genaue Schätzung (± 50 %) der Rezeptorpartikelzahl pro Milliliter (RU/ml) notwendig. Sie kann aus der kinetischen Rezeptoraktivität KA nach der Formel

$SA(\text{geschätzt})[\text{RU/ml}] = KA[1/\text{sec}] \cdot \text{Avogadrosche Zahl}/(k_1 \cdot 10^{-3})$

abgeschätzt werden. Mit $k_1 = 1.7 \cdot 10^7$ Liter/(Mol·sec) (121) für ein Puffersystem mit 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 0.3 % Triton X-100, 10 mMol/l NaCl und 0.05 % NaN_3 und der Avogadroschen Zahl $6.023 \cdot 10^{23}$ RU/ml ergibt sich hieraus:

$SA(\text{geschätzt})[\text{RU/ml}] = KA[1/\text{sec}] \cdot 3.5 \cdot 10^{13}$ [RU·sec/ml].

Zur genauen Bestimmung wurden Proben mit geschätzt 0.5 - $1.0 \cdot 10^{10}$ RU/ml mit variierender Menge Phagen bei 35 °C inkubiert, sodass die Rezeptormenge im Idealfall ausreichte, um zwischen 30 und 70 % der anwesenden Phagen zu inaktivieren. Es hat sich als zweckmässig erwiesen, den Phagentiter zwischen $2.5 \cdot 10^9$ und $8 \cdot 10^{10}$ PFU/ml jeweils durch Verdoppelung zu steigern. Verwendet wurde der oben für die Definition von k_1 beschriebene Puffer. Aus diesen Proben wurde im Stundenabstand 8 - 10 Stunden lang ein Aliquot von 0.1 ml entnommen und nach entsprechender Verdünnung in G-Lösung viermal ausplattiert (s. 2.4.4.1). Zur Auswertung wird der Quotient aus den Mittelwerten der überlebenden Phagen und der eingesetzten Phagen (Kontrollreihe) gegen die Zeit aufgetragen. Der Phagentiter derjenigen Proben, bei denen die Phagen im Überschuss über den Rezeptor vorlagen, ändert sich

unter den angegebenen Bedingungen nach 2 - 4 Stunden nicht mehr. Aus den Plateaus dieser Kurven wurde SA berechnet.

2.4.4.5 Kinetische Messungen bei verschiedenen Temperaturen

Um sicher zu gehen, dass die Spaltung der Partikel in ihrem thermodynamischen Gleichgewichtzustand war, wurde die Rezeptor-Lösung für die Temperaturabhängigkeit bereits einige Wochen vor dem Experiment in zehnfacher Protein-Konzentration im verwendeten Puffer angesetzt.
Für die Experimente wurden 0.1 ml dieser Lösung zu 0.8 ml 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, mit 10 mMol/l Natriumchlorid (suprapur, da die in p.a. Natriumchlorid vorhandene Mg^{2+}-Menge die Kinetik stört), 0.05 % Natriumazid und 0.3 % Triton X-100 gegeben und zumindest 1 h bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert. Nach der Zugabe von 0.1 ml Phagen im gleichen Puffer waren im Ansatz $3.0 \cdot 10^{10}$ RU/ml und $2.0 \cdot 10^{8}$ PFU/ml vorhanden. Aus den Proben wurden in einstündigen Intervallen jeweils 0.1 ml entnommen, welche sofort um die notwendigen Zehnerpotenzen in G-Lösung verdünnt und anschliessend viermal ausplattiert wurden. Bei weniger als 50 erwarteten Plaques pro Platte wurde auch die nächst geringere Zehnerpotenz ausplattiert. Die Mittelwerte der Plaques auf den vier Platten wurden für die Berechnungen verwendet. Die Temperatur der verwendeten Wasserbäder war ± 0.1 °C konstant.

2.4.5 Säulenchromatografische Methoden

2.4.5.1 Gelfiltration

Chromatografiesäulen aus den verwendeten Gelen Bio-Gel A-50m, Bio-Gel A-1,5m (Bio-Rad, München) und Ultrogel AcA 34 (LKB) wurden entsprechend den jeweiligen Herstellerangaben gepackt und die Fliessgeschwindigkeiten jeweils im Bereich der optimalen Trennfähigkeit gehalten. Bei Trennungen in Triton X-100-haltigen Puffern wurde das Triton erst nach Fertigstellung der Säule zum

Puffer gegeben um Blasenbildung in der Säule zu vermeiden. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Säulen mit mindestens zwei Säulenvolumen Puffer equilibriert. Auch bei Erhöhung der Säulentemperatur wurde zunächst mit zwei Säulenvolumen Puffer gespült.

2.4.5.2 Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen

Zur Kalibrierung von Gelfiltratonssäulen wurde ein Gemisch bekannter Proteine unter exakt den gleichen Bedingungen (Puffer, Fliessgeschwindigkeit) aufgetrennt wie im zu vergleichenden Säulenlauf. Verwendet wurden Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Lactatdehydrogenase, Rinderserumalbumin und Ovalbumin (alle Serva). Keines der Proteine mit mehreren Untereinheiten wurde mit 0.3 % Triton aufgespalten. Die Proteine lassen sich durch Lowry-Proteinbestimmung von Aliquots, kombiniert mit der Messung der Extinktion bei 405 nm, identifizieren. Das Ausschlussvolumen der Säulen wurde mit Dextranblau (Pharmacia) gemessen.
Beim Sammeln der Fraktionen nach Tropfenzahl muss berücksichtigt werden, dass die Tropfengrösse in Fraktionen, in denen das Protein eluiert wird, durch die Änderung der Oberflächenspannung reduziert wird. Hierfür muss eine geeignete Korrektur durchgeführt werden, da in den analytischen Säulenläufen, in denen nur ein Bruchteil der zur Eichung verwendeten Proteinmenge aufgetragen wurde, mit einer solchen Volumenänderung nicht zu rechnen ist. Es hat sich als zweckmässig erwiesen, zur Bestimmung eines solchen Korrekturfaktors unmittelbar anschliessend an die gemeinsame Auftrennung der Eichproteine einen zweiten Eichlauf durchzuführen, der nur dasjenige Protein mit dem geringsten Molekulargewicht enthielt. Für den Korrekturfaktor K gilt dann: $K=(F(2)-F(V_0))/(F(1)-F(V_0))$, worin F(2) die Fraktionsnummer ist, bei der das Protein im Einzellauf eluiert wird, F(1) die entsprechende Fraktion des gemeinsamen Laufes und $F(V_0)$ die Fraktionsnummer des Ausschlussvolumens. Korrigiert werden nur die Fraktionsnummern oberhalb des Ausschlussvolumens. Für sie gilt: $F_k=(F-F(V_0))\cdot K+F(V_0)$.

Für die Eichung über den Stokes-Radius sei auf (1), (2) und (105) verwiesen. Das hier vereinfachend an Stelle des Verteilungskoeffizienten verwendete K_{av} errechnet sich aus $(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$ mit V_e, dem Elutionsvolumen der Probe, V_o, dem Ausschlussvolumen der Säule und V_t, dem gesamten Säulenvolumen. Tabellen für die Fehler-Funktion finden sich z. B. bei Jahnke et al. (47).

2.4.5.3 DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie

Verwendet wurde Whatman DE52 DEAE-Cellulose. Säulen wurden entsprechend den Vorschriften des Herstellers gegossen. Die Güte der Packung lässt sich in 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0 mittels des Farbstoffs Pyronin G (Fluka) kontrollieren. Mit Triton-haltigen Puffern wurde erst die fertige Säule equilibriert. Mehrfach verwendete Säulen wurden zwischen den Läufen mit 1 Mol/l NaCl-haltigem Puffer gewaschen und anschliessend mit mindestens drei Säulenvolumen salzfreiem Puffer gespült.

2.4.6 Sonstiges

2.4.6.1 Cloud Point-Bestimmung

Eine mit 1 ml Probe (10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0, 2 % Triton X-100, variabler Natriumchloridzusatz) gefüllte Küvette von Raumtemperatur wurde in das, mittels eines Durchflussthermostaten (90 °C) soweit wie möglich aufgeheizte Küvettengehäuse des ZEISS-Photometers PMQ2 gestellt. Gemessen wurde die Extinktion bei 340 nm und die Temperatur in der Küvette (BRAUN Tastotherm P60-Thermometer). Die Temperatur steigt in dieser Anordnung nicht ganz linear mit ungefähr 0.5 °C/min. Der Cloud Point ist als diejenige Temperatur definiert, bei der die Trübung der Probe steil ansteigt (68).

2.4.6.2 Ultrafiltration verdünnter Rezeptor-Lösungen

Verwendet wurde ein Gerät der Firma AMICON (Ultrafiltration Cell, Model 202) unter <4 kp/cm^2 Stickstoff mit einer PM10-Membran (AMICON, Ausschluss-Molekulargewicht 10 000 D). Bei der Ultrafiltration von Triton-haltigen Lösungen wird hierbei auch das Triton konzentriert, da das Molekulargewicht der Micellen bei Raumtemperatur, je nach verwendetem Puffer, knapp unter 100 000 D (75) liegt. Filtriert man eine 2 %ige Lösung, so enthält das Filtrat ungefähr 0.3 bis 0.4 % Triton. Dies entspricht etwa dem 20fachen der CMC.
Für die Konzentrierung geringer Mengen Protein für die Elektrophorese wurden Utrahülsen UH 100/25 der Firma Schleicher und Schüll verwendet.

2.4.6.3 Phagentropftest

0.1 ml der zu testenden Bakteriensuspension in NB-Lösung mit einem Titer von ungefähr $5 \cdot 10^8$ Bakterien/ml wurden auf einer Hartagar-Platte ausgestrichen und nach fünfminütigem Einziehenlassen mit je 0.005 ml einer T4D-, T4D-os-, T4D-IP$_o$- und T5st-Suspension betropft (10^{10} PFU/ml). Nach 20stündiger Inkubation bei 37 °C sollen sich bei allen vier Phagen völlig klare Lysehöfe bilden.

2.4.6.4 Protease-Versuche

Eine Verdünnung eines ^{14}C-Weidel-Rezeptors (1 h vorinkubiert) wurde mit Enzymlösung versetzt und eine bestimmte Zeit unter den unten angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach Zusatz eines Stop-Reagenz wurde der abgespaltene Teil auf einer Bio-Gel A-50m-Säule (50-100 mesh, 17.5·0.9 cm, 17 Tropfen/Fraktion, entsprechend ungefähr 1 ml, 10 ml/h) abgetrennt. Von einem Drittel jeder Fraktion wurde die Radioaktivität bestimmt. Folgende Messungen wurden mit, zu entsprechender Zeit abgenommenen, Aliquots durchgeführt:

1. Eingesetzte Rezeptoraktivität,
2. Aktivität nach Verdau und Stop-Reagenz-Zusatz,
3. Kontrolle, dass Enzym + Stop-Reagenz keine Phagen inaktiviert,
4. Kontrolle, dass Stop-Reagenz keine Phagen inaktiviert,
5. Kontrolle Phageninput,
6. Kontrolle, dass Enzym + Stop-Reagenz die Inaktivierung nicht beeinträchtigen,
7. Inaktivierung durch 1. Hälfte des Bruchstück-Peaks,
8. Inaktivierung durch 2. Hälfte des Bruchstück-Peaks,
9. Hemmung der Inaktivierung (gleiche Konzentration an Rezeptor wie in 1.) durch 1. Hälfte (nach Konzentrierung) des Bruchstück-Peaks,
10. Hemmung der Inaktivierung durch 2. Hälfte des Bruchstück-Peaks.

Inaktivierungskinetiken wurden über 3 h (jede Stunde ein Punkt) und Hemmkinetiken über 30 h (nach 3, 6, 27 und 30 h jeweils ein Punkt) verfolgt. Die Bedingungen für die verschiedenen Experimente waren:

Trypsin: 10 mMol/l Tris-HCl pH 8.0 (nach (13)) mit 0.04 mg Rezeptor und 0.02 mg Trypsin (Serva) in 1.3 ml, 3 h inkubiert, gestoppt durch Zusatz von 0.2 mg Trypsin-Inhibitor (Serva) bzw. 0.04 mg Rezeptor und 0.00013 mg Trypsin in 1.3 ml, 4 h inkubiert (nach (85)), gestoppt mit 0.0015 mg Trypsin-Inhibitor.

Beim ersten Trypsin-Versuch wurde mit einem Aliquot der Fraktionen die Aktivitäts-Kurve aufgenommen.

Thermolysin: 10 mMol/l Tris-Acetat pH 7.4, 2 mMol/l $CaCl_2$ mit 0.04 mg Rezeptor und 0.0008 mg Thermolysin (Serva) in 1.3 ml, 4 h bei 37 °C (nach (80)) inkubiert, gestoppt mit 0.13 ml 0.1 Mol/l EDTA (pH 7.2) bzw. mit 0.04 mg Rezeptor und 0.00013 mg Thermolysin in 1.3 ml, 4 h bei 20 °C inkubiert und mit 0.13 ml 0.1 Mol/l EDTA gestoppt. Der Säulenpuffer enthielt 10 mMol/l EDTA.

2.5 Mathematische Methoden

2.5.1 Berechnung der kinetischen und thermodynamischen Parameter

Das in Abschnitt 3.4.1 beschriebene, nichtlineare Differential-Gleichungssystem hat die Variablen k_1, k_2, k_3 und k_4. Dieses Gleichungssystem lässt sich normalerweise nur numerisch lösen. Unter der Voraussetzung, dass die Rezeptorkonzentration r_o jedoch gross gegen die Phagenkonzentration p_o ist, wurde von V. Zarybnicky (121) eine explizite Lösung (Gleichung 3a bis 5c, S. 74) abgeleitet. Die ersten drei Geschwindigkeitskonstanten lassen sich aus einer gemessenen Inaktivierungskinetik bestimmen. Da in den, in dieser Arbeit angepassten, Kinetiken die oben genannte Bedingung in allen Fällen erfüllt war (r_o/p_o=150), konnte für die Anpassung die explizite Lösung verwendet werden. Hierbei werden die Geschwindigkeitskonstanten iterativ durch einen Levenberg-Marquardt Algorithmus (Unterprogramm ZXSSQ, International Mathematical and Statistical Libraries, Inc. Houston, Texas 77036, U.S.A., (14)) variiert, in Gleichung 3a eingesetzt, und die Güte der Anpassung an die Messwerte durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate überprüft. Für die Definition der hierfür verwendeten Fehler und Standardabweichungen sei auf (121) verwiesen. Aus den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten, deren zugehörige Kurven den kleinsten Fehler gegenüber den Messwerten aufweisen, wurden wiederum mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die thermodynamischen Konstanten $\Delta H_1^{\ddagger}$, $\Delta H_2^{\ddagger}$, $\Delta H_3^{\ddagger}$, $\Delta S_1^{\ddagger}$, $\Delta S_2^{\ddagger}$ und $\Delta S_3^{\ddagger}$ entsprechend Gleichung 7a (S. 79) bestimmt. Die Berechnungen wurden im Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen auf einem Telefunken TR440-Rechner durchgeführt.

In einer Variante des verwendeten Programms lassen sich die sechs thermodynamischen Grössen auch direkt durch gemeinsame Anpassung von Kinetik-Ergebnissen bei verschiedenen Temperaturen erhalten.

2.5.2 Berechnung der theoretischen Abbildungen

Da bei Abbildung 2 die Bedingung, dass r_0 gross gegen p_0 sein soll, nicht erfüllt war, und bei Abbildung 12 für das um die Gleichung $d\langle ph\rangle/dt = k_4 \cdot p \cdot h - k_5 \cdot \langle ph\rangle$ zu erweiternde Differentialgleichungs-System (vergleiche S. 59 und S. 74) keine explizite Lösung zur Verfügung stand, wurden die Kurven dieser beiden Bilder unter Verwendung des Unterprogramms PRIAPS (STARG-Bibliothek des Rechenzentrums), welches ein Adams-Bashforth-Moulton Verfahren verwendet, numerisch berechnet. Die Kurven zu Abbildung 28 wurden anhand der expliziten Lösung berechnet.

2.5.3 Plot-Programme

Die benutzten FORTRAN IV-Plot-Programme wurden für einen PDP 11/23-Rechner (Digital Equipment Corporation) des Max-Planck-Instituts für Biologie, Abteilung Beermann, unter Verwendung der Plot-Software miniGRAPH der Gesellschaft für elektronische Datenverabeitung (GDV) in Tübingen erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Aktivität von Rezeptorpräparationen

Da im Folgenden immer wieder vergleichend die Aktivität von Rezeptorpräparationen diskutiert wird, seien hier vorab die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zu deren Bestimmung beschrieben.

Die spezifische Aktivität eines Enzyms wird im allgemeinen über die Geschwindigkeit der Substratumwandlung definiert, die eine bestimmte Menge Protein unter festgelegten Bedingungen bewirken kann. Die Einheit der spezifischen katalytischen Aktivität ist Katal/kg, entsprechend 1 Mol/sec·kg (36). Da der Rezeptor nach der Reaktion an den Phagen gebunden bleibt (121, 29), handelt es sich hierbei jedoch nicht um eine katalytische Aktivität. Sogar bei der Zentrifugation im Saccharose-Gradienten ist der Komplex aus Phagenghost und Rezeptorpartikel stabil (122). Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, den Rezeptor direkt mit dem Phagen zu titrieren und den gefundenen Wert auf die vorhandene Proteinmenge zu beziehen. Diese, bereits von Weidel (113) angewandte Methode, soll hier als 'spezifische Rezeptoraktivität' SA (2.4.4.4) bezeichnet werden. Ihre Einheit ist RU/mg, wobei eine Rezeptoreinheit RU diejenige Rezeptormenge ist, die einen Phagen zu inaktivieren vermag (121). Leider verbraucht das Verfahren eine grosse Menge Phagen (ungefähr 10^{11} PFU) und entsprechende Mengen Rezeptor, da bei zu geringer Konzentration der reagierenden Teilchen das Ende der Reaktion unter Umständen erst nach Tagen erreicht würde. Abbildung 2 veranschaulicht dies. Es sind fünf theoretische Kurven dargestellt, bei denen das Verhältnis von Rezeptor zu Phagen jeweils 1:2 ist, deren Konzentrationen sich jedoch um je einen Faktor 5 unterscheiden. Die Kurven wurden unter Zugrundelegung des für die Reaktion von T5-Phagen mit ihrem Rezeptor vorgeschlagenen Modells (120, 121) berechnet, welches nach einem ersten, noch reversiblen Reaktionsschritt (zumindest) einen weiteren, irreversiblen fordert:

$$P + R \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \langle PR \rangle \xrightarrow{k_3} [PR] \xrightarrow{k_4} [GR] + DNS$$

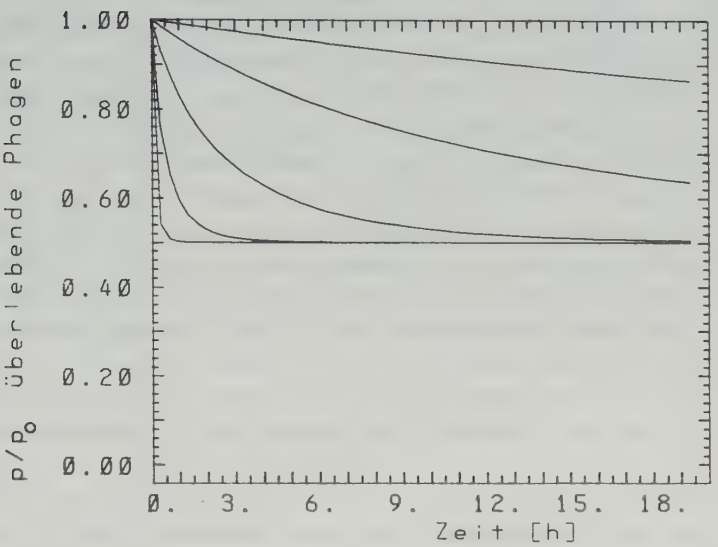

ABBILDUNG 2: Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik der Phageninaktivierung durch Rezeptor, bei einem Verhältnis von 2 Phagen pro Rezeptorpartikel, numerisch berechnet für 35 °C, mit den Geschwindigkeitskonstanten $k_1=8.0\cdot10^6$ 1/(Mol·sec), $k_2=2.1\cdot10^{-6}$ 1/sec, $k_3=7.3\cdot10^{-5}$ 1/sec und den Rezeptorkonzentrationen (von unten nach oben) $1\cdot10^{10}$, $2\cdot10^9$, $4\cdot10^8$, $8\cdot10^7$ und $1.6\cdot10^7$ RU/ml.

Hierin ist P der Phage, R der Rezeptor, <PR> der reversibel gebildete Komplex, [PR] der irreversibel gebildete Komplex und [GR] und DNS die Produkte Phagenghost-Rezeptor-Komplex und ejezierte DNS. Die zur Berechnung von Abbildung 2 verwendeten Geschwindigkeitskonstanten entsprechen einem typischen Fall in Abwesenheit von Triton X-100 bei 35 °C. Wegen des Materialverbrauchs und des grossen experimentellen Aufwands kann diese Methode nur für einige wenige Proben durchgeführt werden und wäre für die Überprüfung des Reinigungsfortgangs des TonA-Proteins ungeeignet. Für die Bestimmung der Anfangskonzentrationen einer kinetischen Messung ist der Wert der Rezeptorteilchenzahl jedoch unabdingbar.

Für die Routinefälle soll hier eine zweite, wie eine Enzymaktivität kinetisch definierte, 'kinetische spezifische Rezeptorak-

tivität' KSA, bzw. die dazugehörige 'kinetische Aktivität' KA, eingeführt werden. Sie beruht auf der Voraussetzung, dass es sich bei der Reaktion zwischen dem T5-Phagen und seinem Rezeptor in der Anfangsphase um eine Reaktion zweiter Ordnung handelt. Hält man die Phagenkonzentration gering, so ist in den allermeisten Fällen die Änderung der Rezeptorkonzentration während der Reaktion zu vernachlässigen, sodass die Reaktion in eine Reaktion pseudo-erster Ordnung übergeht. Für eine solche Reaktion gilt, dass der natürliche Logarithmus des relativen Anteils an überlebenden Phagen gleich dem negativen Wert des Produktes aus einer Geschwindigkeitskonstanten k_1, der Rezeptorkonzentration r_o und der Reaktionszeit t ist: $\ln(p/p_o) = -k_1 \cdot r_o \cdot t$. Dividiert man diesen Wert durch -t, so erhält man die kinetische Aktivität KA, aus der sich durch Division durch die Proteinkonzentration KSA errechnet. Dieses Verfahren stellt jedoch nur eine grobe Näherung dar, welche es ermöglicht, zum Beispiel Aktivitätskurven für Säulenläufe zu erstellen. Es enthält die folgenden Unsicherheiten (120, 121):

1. Obige logarithmische Beziehung gilt nur für den Beginn der Reaktion, d.h. bei nicht allzu grosser Rezeptorkonzentration (kleiner 10^{10} RU/ml) für Messzeiten kürzer als zwei Stunden.
2. Während einer Proteinreinigung könnte sich die Geschwindigkeitskonstante k_1 ändern. Vermutet man dieses, so kann es zweckmässig sein, die Inkubationszeit über eine Stunde hinaus zu verlängern, um Aktivitäten aufzufinden, deren k_1 klein ist. Dies könnte besonders dann zum Tragen kommen, falls z.B. der erste Reaktionsschritt durch einen vom Rezeptorprotein TonA verschiedenen Bestandteil des Rezeptors vermittelt wird, der während der Reinigung abgetrennt wird. Es sei an dieser Stelle allerdings gleich erklärt, dass eine solche stark veränderte Aktivität in keinem Falle aufgefunden wurde.
3. Bei der Messung sehr vieler Proben, wie z. B. bei Säuleneluaten, ist es wünschenswert, die Reaktionsansätze zum Ausplattieren nicht verdünnen zu müssen, sodass man bevorzugt mit ungefähr 2 000 PFU/ml arbeitet. Hierbei wird die Bestimmung bereits bei einer Inaktivierung von ungefähr 95 % der Phagen, also 10 PFU pro Platte, ziemlich ungenau, da hier der Wert bei drei Platten zwischen 5 und 15 streuen kann.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass nur solche Aktivitätsbestimmungen miteinander verglichen werden können, die genau gleich lang inkubiert wurden und dies auch nur dann, wenn die Inaktivierung der Phagen nicht allzu weit fortgeschritten ist. Die hier definierte, kinetische spezifische Aktivität ist über $KSA = \ln 2 / ID_{50}$ mit der in diesem Zusammenhang ebenfalls häufig benutzten Rezeptormenge, welche innerhalb einer Stunde 50 % der Phagen zu inaktivieren vermag (ID_{50}), korreliert. Die verwendete Definition ist auch auf die Charakterisierung der Aktivitäten von Lipopolysaccharid-Präparationen als Rezeptor für den Phagen T4 übertragbar.

3.2 Eigenschaften des 'Weidel'-Rezeptors

Der erste Teil der Arbeit soll, als Voraussetzung für kinetische Messungen, der Klärung einiger Eigenschaften des sogenannten 'Weidel'-Rezeptors für den Phagen T5 dienen. Als Weidel-Rezeptor wird im Folgenden das nach Weidel (113) mittels NaOH-Extraktion von Escherichia coli B gewonnene und nach Braun (13) durch eine Passage über eine Bio-Gel A-50m-Säule von restlichen Membranbruchstücken und niedermolekularen Bestandteilen gereinigte Membranfragment bezeichnet. Eine solche Bio-Gel A-50m-Trennung mit der entsprechenden Aktivitätsverteilung ist in Abbildung 3 exemplarisch dargestellt. Sie zeigt, dass der Rezeptor (mittlerer Peak) aus unserem Stamm bei grösserem Molekulargewicht eluiert wird als z. B. bei (13) dargestellt ist. Die genaue Beschreibung der Isolierung mit ihren Abwandlungen gegenüber den Originalvorschriften findet sich unter 2.4.1.1 (S. 17). Sie verzichtet insbesondere auf die Pankreatin-Behandlung und auf die Essigsäure-Fällung (s.u.).

3.2.1 Zusammensetzung des Weidel-Rezeptors

Auf Grund der einfachen Isolierungsmethode handelt es sich hier um ein stark heterogenes Membranfragment. Abbildung 4 zeigt das Muster der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektropho-

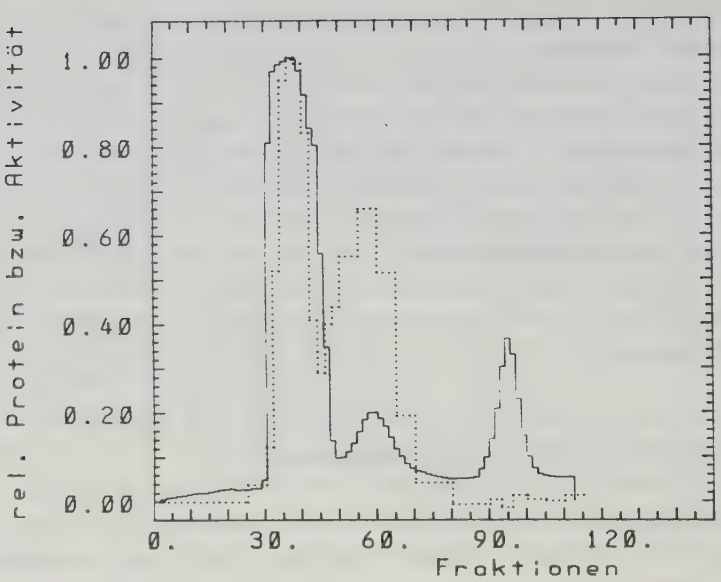

ABBILDUNG 3: Bio-Gel A-50m-Reinigung von Weidel-Rezeptor.
(Ausgezogen: Protein ($\Delta E_{280\ nm}$), punktiert: kinetische Aktivität KA, beide relativ zum Maximum. Säule 2.6·90 cm, Säulenpuffer: 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0, 0.05 % NaN_3, 120 Tropfen/Fraktion (ungefähr 5 ml), 15 ml/h. Es wurde die Hälfte des aus 50 g Bakterien gewonnenen Rezeptors (30 mg) aufgetragen).

rese (2.4.2.9) im Vergleich zur äusseren Membran, gewonnen nach der Methode von Osborn et al. (73). Es enthält neben dem TonA-Protein, dem eigentlichen Rezeptorprotein (11, 13), einen Überschuss an anderen Proteinen der äusseren E. coli-Membran sowie Lipopolysaccharid und Phospholipide. Der in Abbildung 4 gezeigte Rezeptor entstammt einer Extraktion von 10 g Bakterien. Extrahiert man grössere Mengen Bakterien (möglichst nie mehr als 50 g), wie dies für eine Anreicherung des Rezeptorproteins notwendig ist, so wird das Elektrophoresemuster normalerweise noch komplexer gefunden. Dies wurde auch von Braun et al. beschrieben (11).

Für die Analyse der Mengenverhältnisse an Protein, LPS und Phospholipid lässt sich aus den Angaben in (16) für E. coli ein

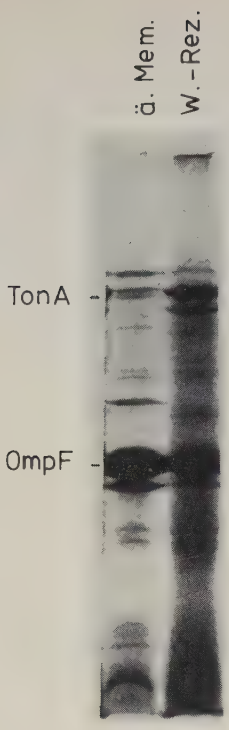

ABBILDUNG 4

'Durchschnittslipid mit einem Molekulargewicht von 715 D und einem Phosphatgehalt von 4.5 % berechnen. Eigene Messungen an aus unserem Stamm isoliertem Lipid (2.4.1.4) ergaben einen Wert von 4.6 % Phosphat. Mit diesem Wert und dem Phosphatgehalt von ebenfalls 4.5 % im Lipopolysaccharid (15, 81) berechnet sich aus der Protein-Bestimmung nach Lowry (2.4.2.1), der LPS-Bestimmung (2.4.2.3) und der Phosphat-Bestimmung (2.4.2.5) ein Massenverhältnis der drei Komponenten Protein, LPS und Phospholipid von 1.00 : 0.79 : 0.48 (gelegentlich wurde auch weniger LPS gefunden, Minimum 0.21). Vergleicht man diese Werte mit der Zusammensetzung der äusseren Membran, wie sie z.B. von Osborn et al.((73), 1.00 : 0.27 : 0.27), DiRienzo et al. ((25), 1.00 : 0.60 bis 0.67 : 0.40 bis 0.56) oder Nakayama et al. ((69), 1.00 : 0.98 : 0.43) angegeben werden, oder wie sie sich aus den Angaben von Burnell et al. errechnen lassen ((17), 1.00 : 0.70 : 0.29), so bewegt sich die Zusammensetzung des Weidel-Rezeptors im Rahmen der Verhältnisse für die gesamte äussere Membran. Geht man davon aus, dass in der äusseren Membran das Lipopolysaccharid ausschliesslich in der äusseren Schicht (64) und das Phospholipid zumindest zum allergrössten Teil nur in der inneren Schicht vorkommt (27, 71, 109), so muss es sich beim Weidel-Rezeptor um ein Bruchstück aus der kompletten Doppelschicht handeln. Berücksichtigt man die komplexe Proteinzusammensetztung, so kann man dieses Bruchstück nicht als besonderes Rezeptorpartikel in der Membran interpretieren, sondern allenfalls als einen allgemeinen Membranbaustein, dessen kinetische spezifische Aktivität KSA allerdings um einen Faktor 7.1 höher liegt, als der einer äusseren Membranpräparation nach Osborn (2.4.1.5, Ver-

gleiche auch Abbildung 3, Aktivität der Membranbruchstücke im Ausschlussvolumen zu Aktivität im Rezeptorpeak).
Die von Weidel (113) vorgeschlagene Behandlung des Rezeptors mit Pankreatin (Merck) (2.4.1.2) vermag über 90 % der vorhandenen Phospholipide herauszulösen (1.00 : 0.80 : 0.03). Da Pankreatin neben Lipase- jedoch auch Protease-Aktivität (ferner auch Amylase (61)) enthält, kommt es hierbei auch zu erheblichen Verlusten an Rezeptoraktivität. Während ungefähr 30 % des Proteins mit dem Lipid abgespalten wird, erhöht sich die spezifische Aktivität KSA (2.4.4.3) nur geringfügig (knapp 10 %, vergl. auch (13)). Aus diesem Grund wurde für die im Folgenden verwendeten Rezeptorpräparationen auf die Pankreatin-Behandlung verzichtet.

3.2.1.1 Lipopolysaccharid im Weidel-Rezeptor

Trotz des grossen Anteils an LPS im Weidel-Rezeptor (35 % der Trockenmasse), hat dieses praktisch nicht die Fähigkeit, den Phagen T4 zu inaktivieren (113). Dies kann nicht auf chemische Veränderungen des LPS während der Präparation zurückgeführt werden, da nach der Extraktion des Proteins aus dem Weidel-Rezeptor mittels Phenol Partikel zurückbleiben, die T4 Phagen inaktivieren können (113). Auch das Lipopolysaccharid, welches nach der NaOH-Rezeptorextraktion (2.4.1.1) aus den verbliebenen Zellresten mittels der PCP-Methode (2.4.1.3) erhalten wird, hat die gleiche Fähigkeit T4 Phagen zu inaktivieren wie LPS, das aus frischen Zellen gewonnen wurde: gemessen in 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 100 mMol/l Natriumchlorid, 1 mMol/l Magnesiumchlorid, 0.05 % Natriumazid und 0.04 % Triton X-100, erhält man für aus frischen Zellen isoliertes LPS eine kinetische spezifische Aktivität von 660 ml/mg LPS·h und für das nachträglich aus den Zellresten gewonnene 630 ml/mg LPS·h.

3.2.2 Stabilität des Rezeptorkomplexes

Der isolierte Weidel-Rezeptor zeigt grosse Homogenität und auffallende Stabilität in verschiedenen Medien. Abbildung 5 zeigt in a das Elutionsprofil des Rezeptors auf einer Bio-Gel A-50m-Säule im Präparationspuffer der Rezeptorreinigung. Auch der Zusatz von 5 mMol/l EDTA (b), welcher das Herauslösen von LPS bewirken könnte (s. z. B. (52) und (24)), führt zu keiner Verschiebung des Proteinpeaks. Das gleiche gilt für Tris-Puffer in c und d. Erhöht man die Ionenstärke durch Zusatz von 50 mMol/l Natriumchlorid (e), so bleibt die Grösse ebenfalls erhalten. Gibt man allerdings 30 mMol/l Magnesiumchlorid hinzu, so fällt der Rezeptor aus.

3.2.3 Grösse des Weidel-Rezeptors

Für die Interpretation thermodynamischer Daten von Reaktionen verschiedener Rezeptorpräparationen mit T5-Phagen ist die Grösse der miteinander reagierenden Partikel von besonderer Bedeutung. Da für die Säulenchromatografie für den benötigten Bereich 1 - $50 \cdot 10^6$ D keine geeigneten Marker vorhanden sind, bietet sich hier, insbesondere dank der guten Homogenität, die analytische Ultrazentrifugation an. Die unter verschiedenen Bedingungen für den Weidel-Rezeptor gefundenen Svedberg-Sedimentationskonstanten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

	Weidel-Rezeptor	Weidel-Rezeptor Pankreatin-behandelt
H_2O	181 S	181 S
300 mM NaCl	193 S	181 S
90 % D_2O	62.4 S	nicht bestimmt

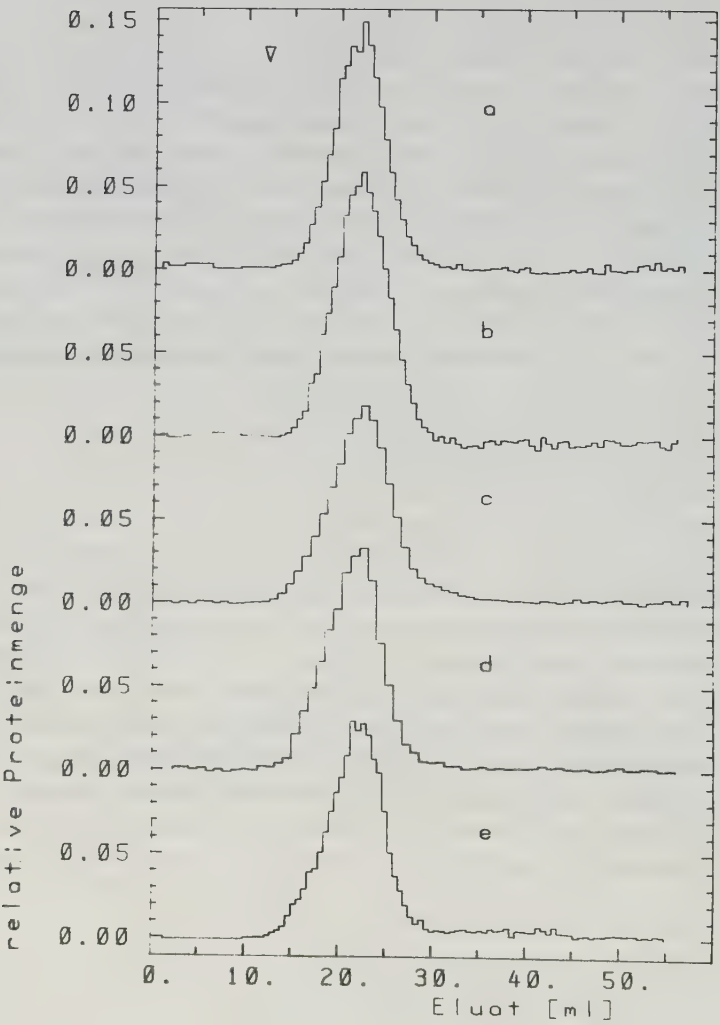

ABBILDUNG 5: Analytische Bio-Gel A-50m-Läufe von gereinigtem Weidel-Rezeptor in verschiedenen Puffern. (Säule 0.9·58 cm, 15 °C, 2 ml/h, aufgetragene Menge: jeweils 0.032 mg Rezeptorprotein). Die Proteinkonzentrationen wurden in a und b mittels der Fluram-Methode (2.4.2.2) und in c bis e durch Messung der Radioaktivität eines ^{14}C-Proteinhydrolysat-markierten Rezeptors bestimmt. Die Flächen unter den Kurven wurden auf 1.0 normiert. Der Pfeil bezeichnet das Ausschlussvolumen. a: 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.4, 0.02 % NaN_3, b: wie a, mit 5 mMol/l EDTA, c: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 0.02 % NaN_3, d: wie c, mit 5 mMol/l EDTA, e: wie c, mit 50 mMol/l NaCl.

Sie wurden bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 0.04 mg/ml gemessen. Die Verwendung der UV-Optik der Zentrifuge ermöglichte diese geringe Konzentration, sodass auf die Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskonstanten verzichtet werden konnte, da der Effekt der Viskosität in diesem Konzentrationsbereich zu vernachlässigen ist. Für die mathematische Auswertung der Ultrazentrifugen-Scans sei auf die Methoden verwiesen (2.4.3 - 2.4.3.3). Die Dichte des Rezeptorpartikels lässt sich aus den Werten 181 S in Wasser und 62.4 S in 90 %igem D_2O zu 1.15 g/cm^3 berechnen (2.4.3.2). Dies entspricht genau dem von Weidel et al. (113) in Rohrzucker-Lösung gefundenen Wert. Die dort angegebene Sedimentationskonstante von 73 S unterscheidet sich jedoch erheblich. Dies kann drei Gründe haben: 1. wird unser Rezeptor im nativen Zustand bei grösserem Molekulargewicht eluiert, 2. wurde der hier beschriebene Rezeptor nicht, wie es die Weidel-Vorschrift beschreibt, mit 20 % Essigsäure gefällt und 3. wurde die Weidelsche Messung bei ungefähr der 40fachen Proteinkonzentration durchgeführt; dies könnte bereits zur Änderung der Viskosität der Lösung führen.
Erstaunlich ist, dass das nahezu völlige Herauslösen von Phospholipid aus diesen Partikeln mittels Pankreatin zu keiner wesentlichen Änderung des Verhaltens führt.
Eine Sedimentationskonstante von 181 S würde, mit der unter (2.4.3.3) angegebenen groben Näherungsformel berechnet, bei einer Dichte von 1.15 g/cm^3, einem Molekulargewicht von $47.5 \cdot 10^6$ D und einem Durchmesser von 46.6 nm entsprechen. Für den nach der Originalvorschrift hergestellten Rezeptor wird von Weidel et al. (113) ein Molekulargewicht von $11.4 \cdot 10^6$ D und ein Durchmesser von 31 nm (112) angegeben.

3.2.4 Verhalten des Weidel-Rezeptors in Triton X-100-haltigen Puffern

Triton X-100 und andere nichtionische Detergentien, insbesondere jene mit polarem Polyoxyethylen-Anteil, werden sehr häufig zum Herauslösen integrierter Membranproteine verwendet, wobei deren Aktivität in den meisten Fällen nicht zerstört wird (41, 58,

106). Letzteres bedeutet jedoch nicht, dass die native Konformation, die dem Protein in seiner natürlichen Umgebung zukommt, vollständig erhalten bleiben muss. Die vorsichtige Interpretation kinetischer, beziehungsweise thermodynamischer Untersuchungen bietet ein hervorragendes Werkzeug, solche Veränderungen zu erkennen. Auch der Weidel-Rezeptor behält seine Aktivität in Triton-haltigen Medien, die kinetisch gemessene Aktivität scheint sogar erhöht (13, 120, 121).

3.2.4.1 Ionenstärke-Abhängigkeit der Triton-Spaltung

Für die Interpretation dieses Verhaltens wurde zunächst der Effekt von Triton X-100 (im Folgenden häufig nur Triton genannt) auf die Grösse des Rezeptorpartikels in der Gelchromatografie an Bio-Gel A-50m untersucht (Abbildung 6). Um mit Triton eine weitestgehende Spaltung von biologischen Membranen zu erreichen, genügen in der Regel um 2 mg Triton pro mg Membranprotein (20, 42, 49, 60, 62, 70, 98). Gibt man mehr Triton hinzu, so erreicht man durch die Bildung von gemischten Detergens-Lipid-Mizellen bei Detergens-Mizellen-Überschuss zumindest für den Teil des Lipids, der nicht spezifisch mit Proteinen wechselwirkt, eine Befreiung des Proteins von den Lipiden. Die hierzu notwendige Menge ist stark von der aufzuspaltenden Membran abhängig. Für die des Semlicki-Forest Virus werden 4.3 mg Triton pro mg Membranprotein benötigt (41, 42). Lipopolysaccharide sollten sich mit gewissen Einschränkungen ähnlich verhalten. In unserem Falle wurden 0.032 mg Protein in 0.05 ml 0.3 % Triton in 10 mMol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.8 auf die Säule aufgetragen; dies entspricht 4.7 mg Triton/mg Protein.

Es zeigte sich, dass das Elutionsmuster sehr stark von der Ionenstärke abhängt. In jedem Falle wurden die Rezeptorpartikel durch Triton deutlich aufgespalten (vergleiche a mit b bis d). Obwohl jedoch die oben erwähnte Zunahme der Aktivität (KA) in salzfreiem Medium am höchsten ist, um dann mit steigender Ionenstärke wieder abzunehmen (Zarybnicky, unveröffentlicht), erreicht die Aufspaltung erst im Bereich 10 - 50 mMol/l Natriumchlorid ihr Optimum, und bei 300 mMol/l kommt es bereits wieder zu einer deutlichen Aggregation.

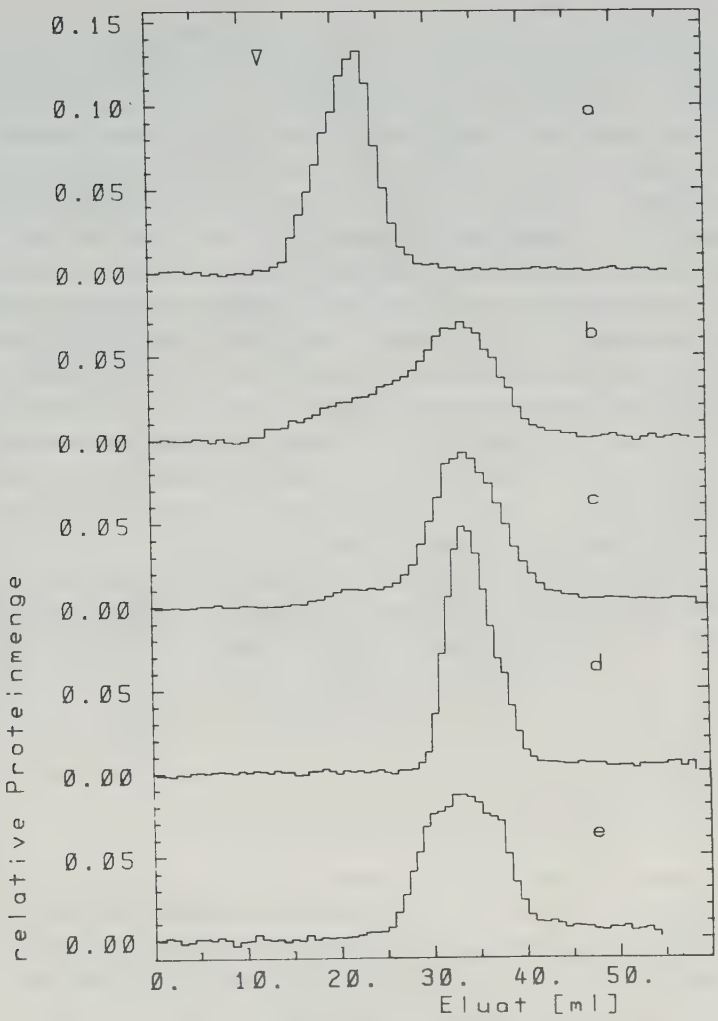

ABBILDUNG 6: Ionenstärke-Abhängigkeit der Triton-bedingten Spaltung von Weidel-Rezeptor auf Bio-Gel A-50m. (Säule: 0.9·58 cm, 15 °C, 2 ml/h; aufgetragene Menge: jeweils 0.032 mg ^{14}C-Rezeptorprotein). Der Proteingehalt wurde über die Radioaktivität bestimmt. Die Flächen unter den Kurven sind auf 1.0 normiert. Der Pfeil bezeichnet das Ausschlussvolumen. In allen Fällen enthielt der Säulenpuffer 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8 und 0.02 % NaN_3 (a). b: wie a, mit 0.3 % Triton, c: wie b, mit 10 mMol/l NaCl, d: wie b, mit 50 mMol/l NaCl, e: wie b mit 300 mMol/l NaCl.

3.2.4.2 Zunahme der Rezeptoraktivität in Triton-Puffer

Die Zunahme der T5-Rezptoraktivität wurde in beiden zitierten Fällen als kinetische spezifische Aktivität, entsprechend KSA, gemessen. Man kann die ihr zugrundeliegende, kinetische Aktivität KA auch als relative Inaktivierungsgeschwindigkeit in der Anfangsphase der Reaktion bezeichnen. Ihr Wert, das Produkt der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und der Rezeptorpartikelkonzentration r_o, ist gleich der Steigung der logarithmisch aufgetragenen Inaktivierungskurve interpoliert auf t=0. Welchem der beiden Faktoren die Aktivitätszunahme zuzuschreiben ist, das heisst, ob sich mit k_1 die Kinetik ändert oder ob durch die Spaltung mehr aktive Partikel entstehen, die im grossen Komplex verborgen waren, lässt sich durch die Titration der Rezeptorpartikel (spezifische Aktivität SA (2.4.4.4)) entscheiden. Während sich KSA in 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8 mit 10 mMol/l NaCl, 0.003 mg/ml Rezeptorprotein und $2 \cdot 10^8$ PFU/ml bei Zugabe von 0.3 % Triton um ungefähr den Faktor zwei erhöht, bleibt SA im Rahmen der Messgenauigkeit (±10 %) konstant. Hieraus folgt, dass die erhöhte Aktivität in Anwesenheit von Triton auf eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten k_1 zurückzuführen ist (121).

3.2.4.3 Konzentrationsabhängigkeit der Spaltung

Die oben bereits erwähnte Abhängigkeit der Aufspaltung des Weidel-Rezeptors vom Triton/Protein-Verhältnis wurde auf einer Bio-Gel A-1.5m-Säule untersucht (Abbildung 7),deren Trennbereich der Grössenverteilung der Spaltprodukte besser entspricht als die oben verwendete Bio-Gel A-50m-Säule. Während bei den beiden grossen Rezeptormengen jeweils der überwiegende Teil ungespalten im Ausschlussvolumen der Säule verbleibt, genügt das Triton/Protein-Verhältnis von 4.7, um den Rezeptor weitestgehend zu zerkleinern. Dies wird verständlich, wenn man sich vor Augen führt, dass bei einem mittleren, grobgeschätzten Molekulargewicht der im Rezeptor enthaltenen Proteine von weniger als 40 000 D (vergleiche Abb. 4) und einer Triton-Mizellengrösse von etwa 100 000 D (75) erst knapp zwei Triton-Mizellen pro Proteinmole-

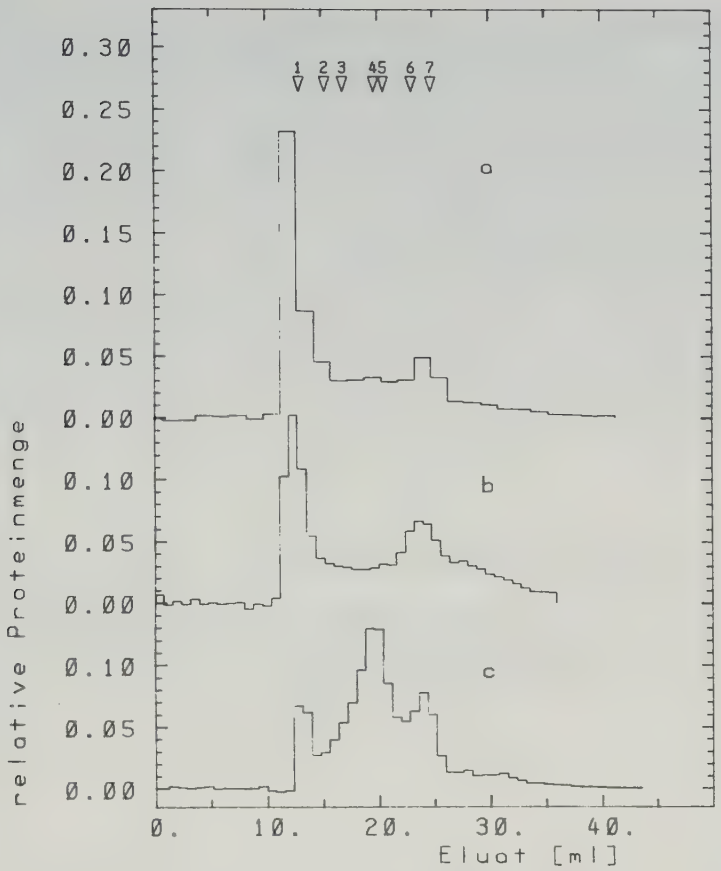

ABBILDUNG 7: Konzentrationsabhängigkeit der Triton-bedingten Spaltung von Weidel-Rezeptor auf einer kalibrierten Bio-Gel A-1.5m-Säule (0.9·58 cm, 15 °C, 2 ml/h, Säulenpuffer: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 0.02 % NaN_3, 50 mMol/l NaCl, 0.3 % Triton X-100). Aufgetragen wurden nach 1 h Vorinkubation bei 15 °C a: 0.15 mg, b: 0.06 mg und c: 0.032 mg Rezeptorprotein in jeweils 0.05 ml Puffer, sodass das Verhältnis von Triton zu Protein 1.0, 2.5 und 4.7 betrug. Die Markierungen bezeichnen die Elutionsvolumina von 1: Hauptpeak Dextranblau, 2: Thyroglobulin (669 000 D), 3: Ferritin (440 000 D), 4: Katalase (232 000 D), 5: Lactatdehydrogenase (140 000 D), 6: Rinderserumalbumin (67 000 D) und 7: Ovalbumin (43 000 D). Die Flächen unter den Kurven sind auf 1.0 normiert.

kül zur Verfügung stehen. Bei angenommener, vollständiger Solubilisierung kann aber jedes integrierte Membranprotein ungefähr die Tritonmenge einer Mizelle binden (58). Aus statistischen Gründen können jedoch bei einem Verhältnis von 2 Detergens-Mizellen auf ein Proteinmolekül erst 77 % der Proteinmoleküle separat in einer Mizelle vorliegen (84), während es bei einem Verhältnis von 10:1 bereits 96 % sind. Interessant ist, dass bei zunehmender Solubilisierung zunächst relativ kleine Proteine herausgelöst werden (a,b), während bei ausreichend zur Verfügung stehendem Triton (c) der Schwerpunkt der Detergens-Protein-Mizellen zwischen 100 000 und 300 000 D eluiert wird. Die Rezeptoraktivität wird aber in keinem der drei Läufe als einzelner Peak freigesetzt, sondern bleibt über den ganzen Bereich verteilt.

3.2.4.4 Abtrennung des Lipopolysaccharids

Inwieweit bei ausreichender Tritonmenge das LPS von den Proteinen abgetrennt wird, zeigt Abbildung 8. Im gleichen Puffer wurde ungefähr ein Drittel der Proteinmenge von Abbildung 7c eines mit ^{3}H-Glucose und ^{14}C-Aminosäuren doppeltmarkierten Weidel-Rezeptors aufgetragen (Verhältnis von Mizellen zu Proteinmolekülen ungefähr 15:1). Die Kontamination von ^{3}H-Label im Protein und von ^{14}C-Label im Lipopolysaccharid war vernachlässigbar gering. Das gelöste Lipopolysaccharid bildet mit Triton gemischte Mizellen, die nicht, wie erwartet, um 100 000 D eluiert werden, sondern bei ungefähr 50 000 D (rechter Peak im oberen Teilbild, punktiert). Die Fläche unter diesem Peak entspricht 48 % des gesamten Lipopolysaccharids. Auch wenn man, wie von Schnaitman (89, 90) vorgeschlagen, 5 mMol/l EDTA zum Säulenpuffer gibt, um den durch divalente Kationen quervernetzten Anteil an LPS herauszulösen (51), wird nur unwesentlich mehr freigesetzt (57 %, Mitte, punktiert). Verwendet man an Stelle von Triton Desoxycholat, welches sehr kleine Mizellen bildet, so wird zwar der Anteil des herausgelösten Lipopolysaccharids erhöht (66 %, rechter Peak, punktiert, unten), die zurückbleibenden Proteine sind aber wesentlich schlechter aufgespalten. Es scheinen also recht feste

Bindungen zwischen einzelnen Proteinen und dem Lipopolysaccharid zu bestehen. Das gebundene LPS tauscht auch nicht gegen freies aus: inkubiert man einen dreifachen Überschuss an radioaktiv markiertem LPS mit unmarkiertem Rezeptor (10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3 und 0.3 % Triton X-100; 0.03 mg Rezeptor-Protein mit 0.024 mg ^{14}C-LPS) für 20 h bei 40 °C und trägt das Gemisch anschliessend auf eine Säule ent-

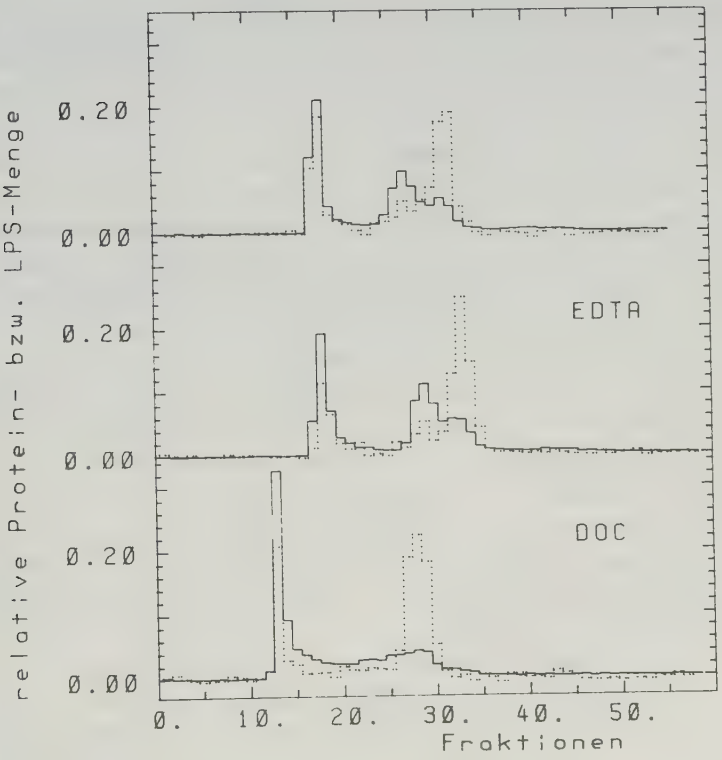

ABBILDUNG 8: Abspaltung von ^{3}H-Lipopolysaccharid (punktiert) vom ^{14}C-Weidel-Rezeptor-Protein (ausgezogen) in Triton- und Desoxycholat-haltigem Puffer. (Säule 0.9-58 cm, 15 °C, 2 ml/h, aufgetragene Menge: jeweils 0.01 mg Rezeptorprotein in 0.05 ml Puffer). Oben: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, 50 mMol/l NaCl, Mitte: wie oben plus 5 mMol/l EDTA, unten: 10 mMol/l Tris, 0.3 % Natriumdesoxycholat pH 8.0, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3. Die Flächen unter den Kurven sind auf 1.0 normiert.

sprechend Abbildung 8 auf, so wird die ganze Radioaktivität als symmetrischer Peak um 50 000 D eluiert (nicht gezeigt). Die Kontrolle, dass es sich hierbei nicht um die Freisetzung allen LPS handelt, sodass das zurückbleibende Protein kein LPS mehr gebunden hat, wurde durchgeführt.

3.2.4.5 Temperaturabhängigkeit der Spaltung

Da zur Ableitung von thermodynamischen Daten einer Reaktion Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden müssen, ist die Temperaturabhängigkeit der Grösse der Reaktionspartner, insbesondere wenn einer von ihnen sehr komplex zusammengesetzt ist, von besonderer Bedeutung (Abbildung 9). Während in Abwesenheit von Triton (9a) auch bei der höchsten untersuchten Temperatur von 40 °C keine niedermolekularen Bruchstücke entstehen, also alles Protein auf der Bio-Gel A-1.5m-Säule im Ausschlussvolumen eluiert wird, zeigt das System bei Zusatz von 0.3 % Triton eine erhebliche Temperaturabhängigkeit (b,c). Teilbild 9b ist identisch mit 7c und wurde bereits dort beschrieben. Bei erhöhter Temperatur (9c) werden zum einen auch die letzten hochmolekularen Reste gespalten, während zum anderen die herausgelösten niedermolekularen Proteine zum grössten Teil jetzt auch in Mizellen eingebaut werden, sodass der rechte Peak von b verschwindet. Dies bedeutet natürlich nicht, dass nun alle Proteinmoleküle voneinander separat, jedes in einer Mizelle, vorliegen, da der Molekulargewichtsbereich sich von 30 000 bis ungefähr 10^6 D erstreckt.

Bei der Diskussion der Spaltung von biologischen Membranen durch Detergentien wird häufig darauf hingewiesen, dass dieser Vorgang unter Umständen sehr langsam vor sich geht (84), sodass man aus Teilbild b und c auch schliessen könnte, dass die Spaltung in b ihr thermodynamisches Gleichgewicht noch nicht erreicht hat und in c lediglich weiter fortgeschritten ist. Dass dem hier nicht so ist, belegt Teilbild 9d, bei dem die Probe, genau wie bei b, vor dem Auftragen zunächst 1 h bei 40 °C vorinkubiert wurde, um nach 10 min bei 15 °C auf einer Säule von 15 °C aufgetrennt zu werden. Die Aufspaltung scheint in gewissen Grenzen reversibel

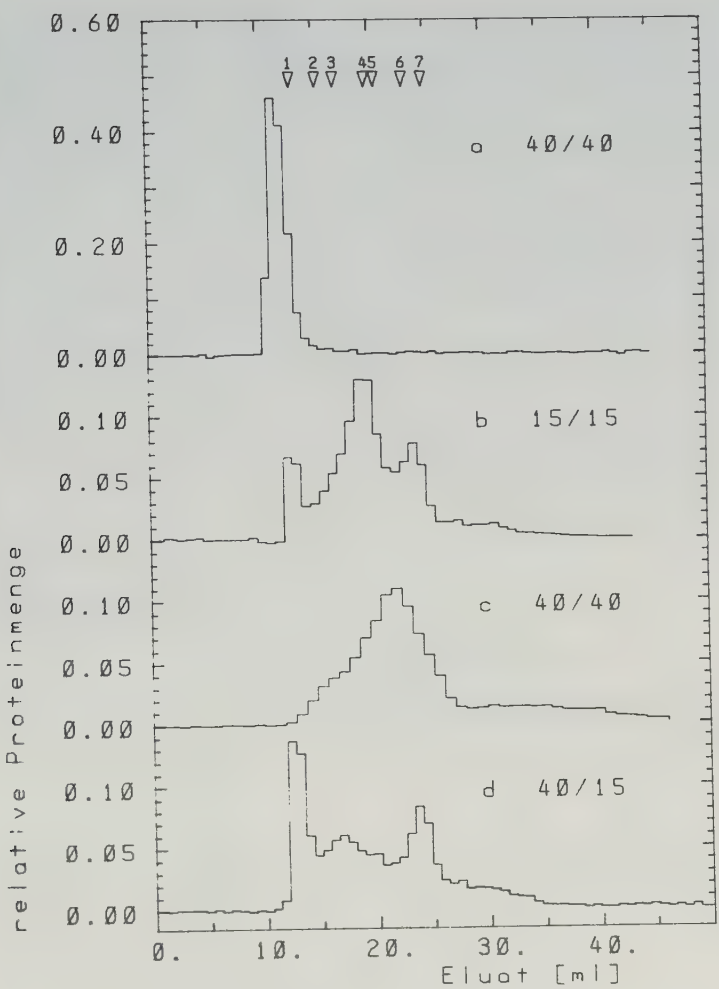

ABBILDUNG 9: Temperaturabhängigkeit der Triton-bedingten Spaltung von ^{14}C-Weidel-Rezeptor (Säule identisch zu Abbildung 7, Eichproteine siehe dort). Puffer: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 50 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton (a: ohne Triton). Die zwei Zahlen bezeichnen jeweils die Temperatur während der einstündigen Vorinkubation der Probe vor dem Auftragen auf die Säule / die Temperatur der Säule. Die Flächen unter den Kurven sind auf 1.0 normiert.

zu sein.
Die Läufe zu den Abbildungen 7 und 9 wurden auf der gleichen kalibrierten Bio-Gel A-1.5m-Säule durchgeführt, deren Eichkurve zur leichteren Orientierung in Abbildung 10 wiedergegeben ist. Da die Gelfiltration eigentlich nicht nach dem Molekulargewicht der Partikel, sondern vielmehr nach deren hydrodynamischen Eigenschaften, die ihre Symmetrie mitberücksichtigen, auftrennt, ist in der oberen Skalierung auch die von Ackers (1) vorgeschlagene Eichung mit dem Stokes Radius aufgetragen. Die Werte wurden (105) und (77) entnommen. $Erf^{-1}(1-K_{av})$ stellt hierin den Wert der inversen Fehlerfunktion des Arguments $(1-K_{av})$ dar, wie dies von Tanford et al. (105) vorgeschlagen wurde. Als Vereinfachung wurde hier der in (105) an dieser Stelle verwendete Verteilungskoeffizient K_d durch das einfacher zu bestimmende K_{av} (77) ersetzt, welches sich nur um einen konstanten Faktor unterscheidet. Für die Berechnung sei auf die Methoden verwiesen (2.4.5.2). Der Stokes Radius ist auch diejenige Grösse, die bei

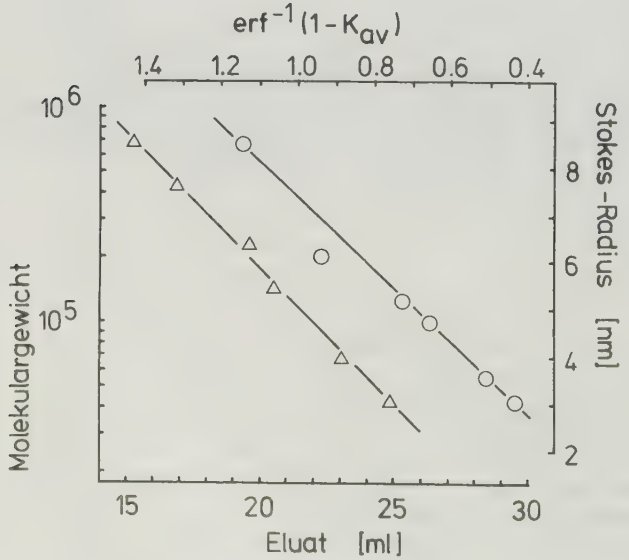

ABBILDUNG 10: Kalibrierung der Säule zu den Abbildungen 7 und 9.

der Interpretation von Diffusionsanteilen von Reaktionsgeschwindigkeiten herangezogen werden muss. Hierauf wird im kinetischen Teil noch zurückzukommen sein. Der Eichlauf wurde in 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8 mit 10 mMol/l Natriumchlorid und 0.3 % Triton X-100 durchgeführt. Da lösliche Proteine, wie sie hier verwendet wurden, nur einige Moleküle Triton zu binden vermögen (41, 58) (BSA bindet zum Beispiel ungefähr fünf (103), was einem Fehler von 3 000 D entspräche, die anderen weniger als 1-3 % ihres Eigengewichts (19)), wurde von diesbezüglichen Korrekturen abgesehen.
Aus allem Gesagten wird leicht einsichtig, warum die thermodynamische Untersuchung der Reaktion zwischen T5-Phagen und dem Weidel-Rezeptor von Zarybnicky et al. (121) in Anwesenheit von Triton zu grösserer statistischer Streuung und schwierigerer Interpretierbarkeit der Ergebnisse geführt hat. Wünschenswert wäre, diese Experimente, wo nicht mit reinem TonA-Protein, so doch zumindest mit einer weitgehend gereinigten Präparation desselben, die im genannten System eine temperaturunabhängige Grösse hat, zu ergänzen.

3.2.5 Behandlung des Rezeptors mit Proteasen und Untersuchung der Aktivitätseigenschaften der hierbei erhaltenen Bruchstücke

Viele Proteine lassen sich durch Proteasen in Bruchstücke spalten, wobei die Aktivität des Proteins in einem der Bruchstücke erhalten bleibt. Da lösliche Proteine in der Regel kompakte Partikel darstellen, deren aktive Bereiche durch, unter Umständen in der Primärstruktur sehr weit voneinander entfernt liegenden Aminosäuren gebildet werden, während integrierte Membranproteine durch ihre Verankerung in der Membran zwangsläufig in ihrer Kette eher in Domänen aufgeteilt sind, wird dieses Verhalten häufiger bei letzteren beobachtet (106). Als Beispiele für beide Fälle seien hier Immunglobulin (22, 72), Muskelmyosin (53), Cytochrom b_5 (46, 95, 110), NADH-Cytochrom b_5-Reduktase (96), die Colicine (9) und das MN-Sialoglycoprotein (93, 114) genannt. Liesse sich vom TonA-Protein ein solches Bruchstück gewinnen, so

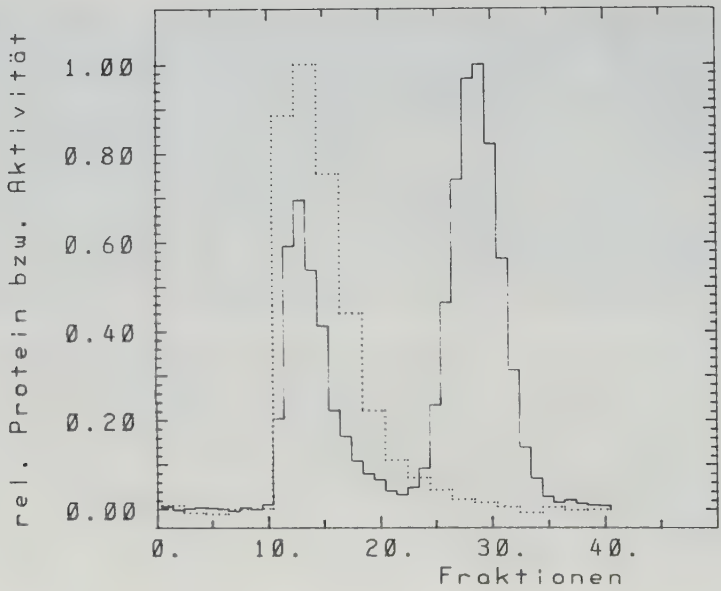

ABBILDUNG 11: Trennung der Spaltprodukte des ^{14}C-Weidel-Rezeptors nach Behandlung mit Trypsin auf Bio-Gel A-50m (1 mg Trypsin/ 2 mg Rezeptorprotein). Säule: 0.9·17.5 cm, 10 ml/h, 17 Tropfen/Fraktion, entsprechend ungefähr 1 ml. Neben dem ^{14}C-Gehalt (ausgezogen) ist punktiert die kinetische Aktivität KA wiedergegeben (beide bezogen auf das jeweilige Maximum).

böte sich unter Umständen die Möglichkeit, die komplizierte, mehrstufige Reaktion zwischen Rezeptorprotein und T5-Phagen in Teilschritte zu unterteilen. Leider ist dies mit den zwei bislang untersuchten Enzymen nicht gelungen.

Der Aufbau des Versuchs (2.4.6.4) sei hier kurz wiedergegeben: eine Rezeptorprobe wird mit der Protease inkubiert und nach Zugabe des proteinspezifischen Stop-Reagenz auf eine Bio-Gel A-50m-Säule (50 - 100 mesh) aufgetragen. Eine solche Trennung zeigt Abbildung 11 exemplarisch. Man erhält zwei Peaks, grosse Rezeptorpartikel und Spaltprodukte. Letztere könnten zwei Arten von Aktivität aufweisen: 1. die volle Erhaltung der irreversiblen Inaktivierungsfähigkeit; dies liesse sich direkt aus der Aktivitätskurve des Säulenlaufes ersehen. 2. wäre es möglich,

dass ein solches Bruchstück nur noch reversibel an den Phagen binden könnte. Eine solche Aktivität müsste als Hemmstoff für die Wechselwirkung einer bekannten Rezeptormenge mit dem Phagen wirken:

$$\langle PH\rangle \underset{k_5}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} H + P + R \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \langle PR\rangle \xrightarrow{k_3} [PR] \xrightarrow{k_6} [GR] + DNS$$

Die theoretische Auswirkung eines solchen Hemmstoffzusatzes auf

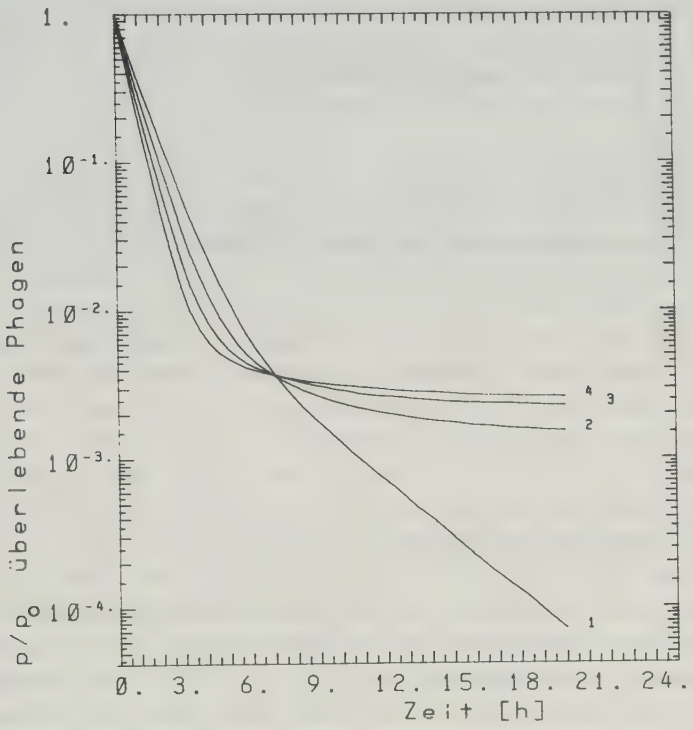

ABBILDUNG 12: Abhängigkeit der Inaktivierungskinetik von einem postulierten, kompetitiven Hemmstoff bei einer Phagenkonzentration von $6.7 \cdot 10^7$ PFU/ml und einer Rezeptorkonzentration von $1.0 \cdot 10^{10}$ RU/ml mit $k_1 = k_4 = 1.67 \cdot 10^7$ Liter/Mol·sec, $k_2 = k_5 = 3.35 \cdot 10^{-6}$ 1/sec und $k_3 = 8.47 \cdot 10^{-5}$ 1/sec. Der angenommene Hemmstoffzusatz steigt von 0 (1) über das 0.2- (2) und 0.4- (3) auf das 0.6-fache (4) der eingesetzten Rezeptorkonzentration.

die Inaktivierungskinetik ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Für die Berechnung wurden die Geschwindigkeitskonstanten eines typischen Experiments in Anwesenheit von Triton zugrunde gelegt. Die unbekannten Geschwindigkeitskonstanten k_4 und k_5 wurden gleich k_1 und k_2 angenommen. Für den Fall, dass beim Phagentitrieren ein Teil des reversibel gebildeten <PH> miterfasst wird (nicht <PR>, da k_3 gross gegen k_2), wird dieser Effekt noch deutlicher. In keinem der bislang untersuchten Fälle konnte eine der beiden Aktivitäten gefunden werden. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung der Protease-Versuche.

Tabelle 2

	Enzym:Prot.	abgespalt. Prot. %	Restakt. % von KA	Zuwachs an KSA
Trypsin	1:2	66.1	62.0	1.83
Trypsin	1:300	28.2	91.5	1.27
Thermolysin	1:50	61.4	93.5	2.42
Thermolysin	1:300	38.7	95.6	1.56

Es fällt eine recht hohe Stabilität gegenüber Thermolysin auf. Hydrophobe Aminosäuren scheinen am TonA-Protein also kaum zugänglich zu sein. Auch bei Trypsin wird die spezifische kinetische Aktivität in beiden Fällen erhöht.

3.3 Anreicherung des TonA-Proteins

Das tonA-Genprodukt aus Escherichia coli in grossen Mengen als reines, natives Protein zu gewinnen, scheitert bislang am geringen Vorkommen in der Membran (26, 50). Dies wird sich hoffentlich in absehbarer Zeit, bei Verwendung von, mit dem Plasmid pL C19-19 (104) transformierten Escherichia coli-Stämmen, bei denen sich der TonA-Anteil deutlich erhöhen lässt, ändern (79). Da unser kinetisches System unter Umständen sehr empfindlich auf genetisch verändertes TonA-Protein reagieren könnte, wurde hier weiter mit dem E. coli B-Stamm gearbeitet, der auch für die Ex-

perimente in (120) und (121) verwendet wurde. Für die Interpretation der kinetischen und thermodynamischen Daten muss ausgeschlossen werden können, dass ein Aminosäureaustausch, der sehr weit vom aktiven Zentrum des Proteins erfolgt ist und nur geringfügige Konformationsänderungen bewirken würde, für die Änderung der Eigenschaften verantwortlich ist und nicht, wie hier untersucht werden soll, die Änderung der chemischen Umgebung des Rezeptorproteins (s.a. (26)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine neue Methode zur Reinherstellung grösserer Mengen TonA-Protein gefunden. Die Ausnutzung der folgenden Prinzipien ermöglichten es jedoch in, für die kinetischen Messungen ausreichender Menge, weitgehend angereichertes TonA-Protein zu gewinnen:

1. Die Kapazität einer Reinigungsmethode ist erst erschöpft, wenn ihre wiederholte Anwendung zu keiner weiteren Abtrennung von Verunreinigungen führt.
2. Bei der Aufspaltung von Membranprotein-Komplexen in Anwesenheit von Detergentien handelt es sich um ein Phasenverteilungsgleichgewicht zwischen ungespaltenen, nicht an allen möglichen Bindestellen der einzelnen Proteine mit Detergens besetzten Protein-Komplexen und der Detergensmizellen-Phase, in der völlig freigesetzte, integrierte Proteine in Mizellen eingebaut sind. Weniger hydrophobe Proteine können durch Absättigung ihrer Bindestellen mit Detergens gelöst vorliegen.

Es wurde ausschliesslich mit der DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie, wie von Braun et al. (13) vorgeschlagen, gearbeitet. Die ursprünglich mangelhafte Aufspaltung lässt sich zum einen durch Erhöhung der Temperatur während des Trennvorgangs erreichen, wie es sich aus den Überlegungen zu Abbildung 9 aufdrängt. Zum anderen bewirkt das Auftragen auf die Chromatografiesäule aus grosser Verdünnung eine Verschiebung des Phasengleichgewichts zu besserer Aufspaltung. Dies kommt einem besonders dann entgegen, wenn ein grosses Volumen von gesammelten Fraktionen eines vorangegangenen Laufs aufgetragen werden soll. Das von Braun et al. vorgeschlagene Puffersystem 10 mMol/l Phosphatpuffer pH 7.0 mit 2 % Triton X-100 mit einem nahezu linearen, flachen Natriumchlorid-Gradienten zwischen 0 und 0.5 Mol/l, hier ergänzt durch 0.05 % NaN_3, enthält zwar das für Anionen-

austausch unübliche Pufferion Phosphat, dies hat jedoch den Vorteil, dass die Proteinbestimmung in den Fraktionen mittels der schnellen, einfachen und insbesondere sparsamen Fluram-Methode (2.4.2.2) erfolgen kann. Versuche mit Tris-Puffer entsprechender Zusammensetzung, in welchem das Tris als primäres Amin die Fluram-Methode nicht zulässt, ergaben keine bessere Auftrennung.

3.3.1 Cloud Point

Will man ein nichtionisches Detergens, wie hier Triton X-100, bei erhöhter Temperatur und steigender Ionenstärke verwenden, so ist das Phänomen des ´Cloud Point´ zu berücksichtigen. Hierunter versteht man das Auftreten eines plötzlichen Anstiegs der Lichtstreuung einer Detergens-Lösung beim Überschreiten einer bestimmten Temperatur (68). Dies wird mit einer mikroskopischen Phasentrennung, bedingt durch sekundäre Aggregation der kleinen Detergensmizellen zu grossen Mizellaggregaten, erklärt (97), welche bei der Ionenaustauschchromatografie zu unabschätzbaren Effekten führen könnte. Abbildung 13 zeigt die Kurven zur Bestimmung der Cloud Points des hier verwendeten Puffersystems. Die Temperatur des Cloud Point sinkt annähernd linear mit steigender Ionenstärke (vergl. (57)) und beträgt ohne Salz 61 °C, mit 0.5 Mol/l Natriumchlorid 56 °C und mit 1 Mol/l 49 °C.

3.3.2 DEAE-Cellulose-Ionenaustauschromatografie von Weidel-Rezeptor bei erhöhter Temperatur

Aus insgesamt 300 g Bakterien (4·40 l Kultur) wurden, wie unter 2.4.1.1 (S. 17) beschrieben, 350 mg Weidel-Rezeptor gewonnen. Dieser wurde aufeinanderfolgend insgesamt viermal einer DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie unterzogen, wobei die ersten zwei Läufe zweimal mit jeweils der Hälfte des Materials auf einer Säule 55·3 cm durchgeführt wurden und beim 3. und 4. Lauf das gesamte Material auf einer Säule 20·1.6 cm aufgetrennt wurde. In allen Fällen wurde 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0 mit 2 % Triton X-100 und 0.05 % NaN_3 verwendet. Nach dem Auftra-

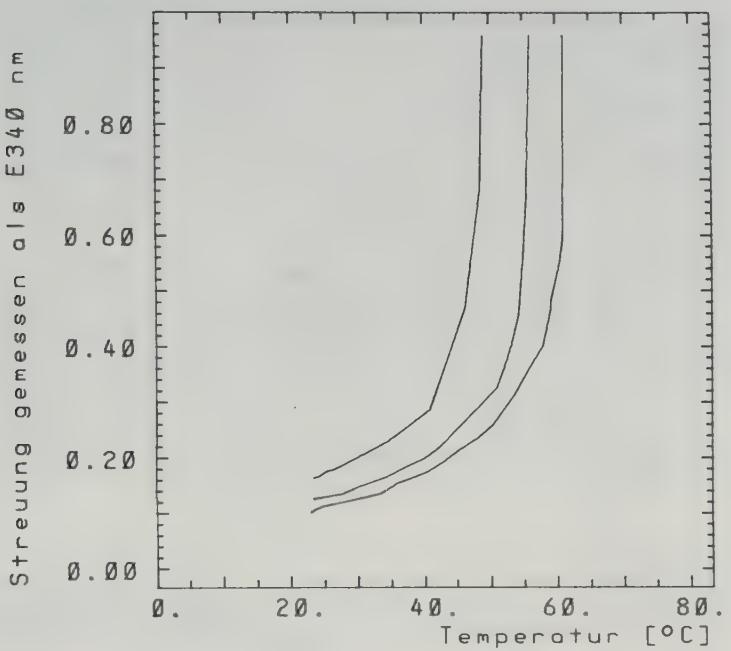

ABBILDUNG 13: Messung des Cloud Point einer 2 %igen Triton X-100-Lösung in 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0, bei steigendem Natriumchlorid-Zusatz (0.0, 0.5 und 1.0 Mol/l NaCl von rechts nach links (vergl. 2.4.6.1)).

gen der Proben wurde mit diesem Puffer gewaschen bis kein ungebundenes Material mehr eluiert wurde und erst dann ein Natriumchlorid-Gradient, wie in den Abbildungen 14 bis 16 angegeben, gestartet.

Da bereits bei Raumtemperatur ein Grossteil an inaktivem Protein abgetrennt werden kann, wurde ein solcher Lauf (1. Lauf, Abbildung 14, oben) denen bei erhöhter Temperatur vorangestellt. Das Verhältnis von Triton zu Protein war 2.5 mg/mg. Der Lauf entspricht dem in (13) vorgeschlagenen Verfahren. Die Aktivität (punktiert) bleibt wegen mangelhafter Aufspaltung der Rezeptorkomplexe unter dem Hauptproteinpeak verborgen. Trägt man die aktivitätenthaltenden Fraktionen (zwischen den zwei Pfeilen) nach Dialyse gegen salzfreien Puffer abermals auf die gleiche Säule

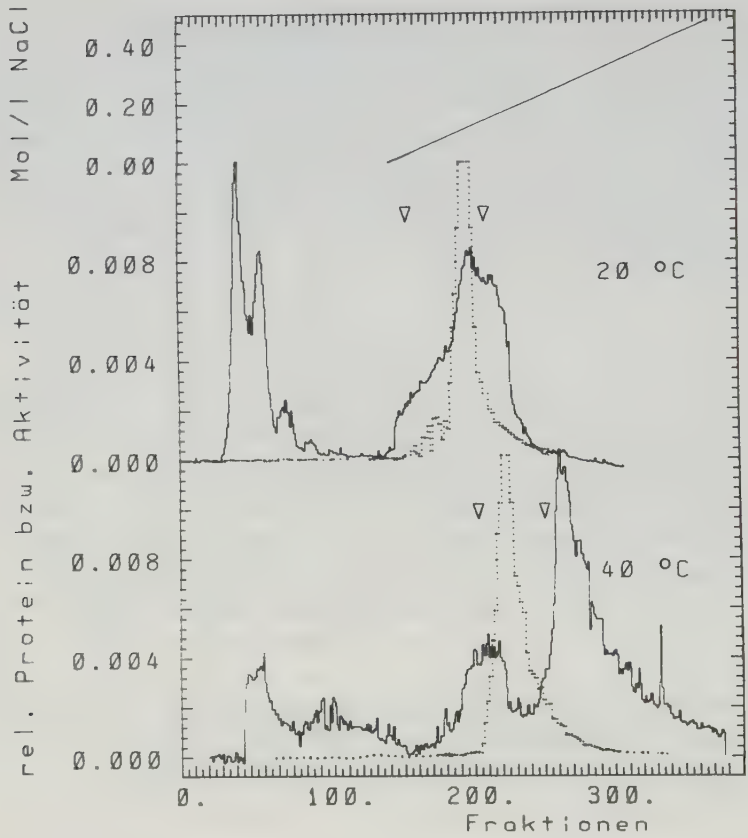

ABBILDUNG 14: Whatman DE52-DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie von Weidel-Rezeptor. (Genaue Beschreibung siehe Text) Oben: Auftrennung von Weidel-Rezeptor bei einer Säulentemperatur von 20 °C, unten: Auftrennung der Aktivität-enthaltenden Fraktionen von oben (zwischen den zwei Pfeilen) bei 40 °C. Ausgezogen: Protein (Flursm), punktiert: kinetische Aktivität KA (beide bezogen auf das jeweilige Maximum).

auf, nachdem diese auf 40 °C temperiert wurde (2. Lauf, Abbildung 14, unten, 30 mg Triton/mg Protein), so verbessert sich die Aufspaltung erheblich. Hierzu muss auch die aufzutragende Lösung während des Auftragens auf 40 °C gehalten werden. Wiederholt man diesen Vorgang (3. Lauf, Abbildung 15, 30 mg Triton/mg Protein),

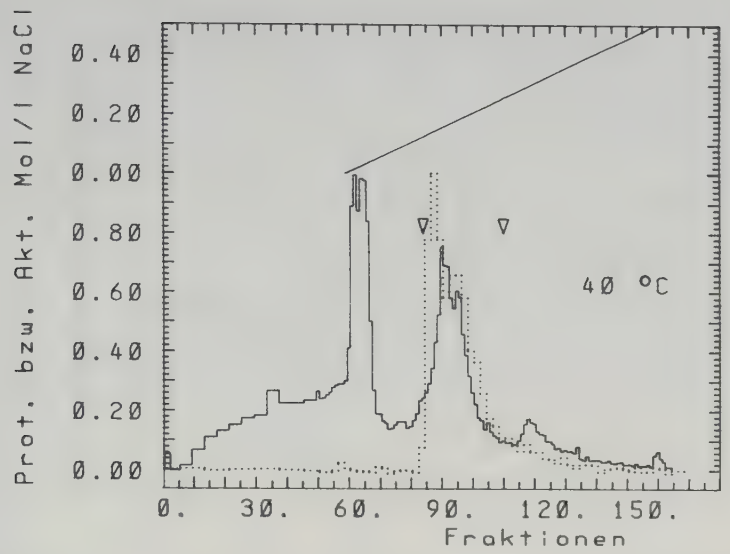

ABBILDUNG 15: DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie der Aktivität-enthaltenden Fraktionen von Abbildung 14 (unten) bei 40 °C. (ausgezogen: Protein, punktiert: kinetische Aktivität KA).

so wird hauptsächlich ein Peak freigesetzt, der unmittelbar nach Start des Natriumchlorid-Gradienten eluiert wird. Die elektrophoretische Kontrolle ergab, dass er reines OmpF enthält. Das in Abbildung 15 (und 16) vor dem Beginn des Gradienten eluierte, mit Fluram fluoreszierende Material zeigt weder in der Lowry-Proteinbestimmung (nach Entfernung von Triton) noch in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese eine der Fluoreszenz entsprechende Menge an Protein.

Da in Abbildung 15 die Aktivität sehr nahe beim benachbarten Proteinpeak eluiert wird, musste im 4. Lauf (Abbildung 16, 40 mg Triton/mg Protein) ein sehr flacher Gradient gewählt werden. Hierbei wurde nochmals OmpF freigesetzt. Abbildung 17 gibt das Elektrophorese-Muster der aktivsten Fraktion wieder. Insbesondere die im Weidel-Rezeptor gegenüber der äusseren Membran angereicherten Proteine mit ähnlicher Grösse wie das TonA-Protein wurden sehr gut abgetrennt (vergleiche Abbildung 4). Die planimetrische Auswertung eines Densitometer-Scans des Gels aus Ab-

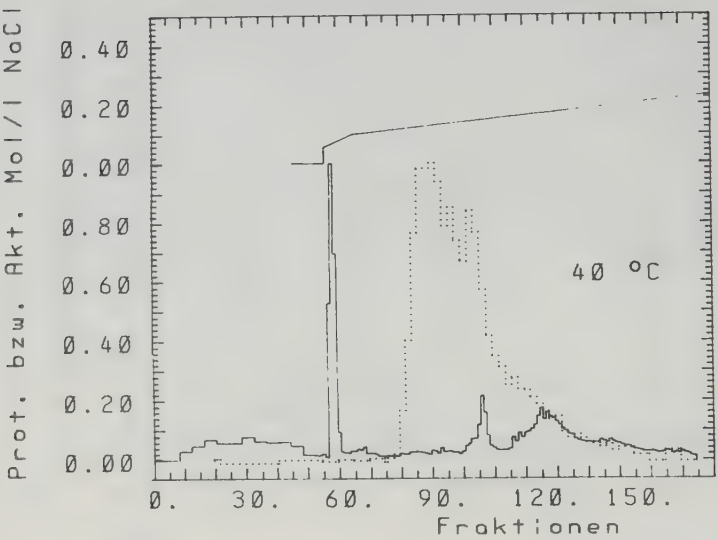

ABBILDUNG 16: DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie der Aktivität-enthaltenden Fraktionen von Abbildung 15 (unten) bei 40 °C. (ausgezogen: Protein, punktiert: kinetische Aktivität KA).

Tabelle 3

	Protein mg	Gesamtakt. ml/h	spez. Akt. ml/h·mg	Ausbeute %	Anreicherung	
Rohextrakt	3300	119790	36.3	100	1.0	
BioGel A50m	350	58380	166.8	48.7	4.6	1.0
1. DEAE-Cel.	156	57127	366.2	47.7	10.1	2.2
2. DEAE-Cel.	28.4	49225	1733.3	41.1	47.8	10.4
3. DEAE-Cel.	13.7	33135	2418.6	27.7	66.7	14.5
4. DEAE-Cel.	0.87	15225	17500	12.7	482.0	104.8

Rohextrakt : NaOH-Extrakt nach differentieller Zentrifugation.
Bio-Gel A-50m: Abbildung 3; 1. und 2. DEAE-Cell.: Abbildung 14.
3. DEAE-Cell.: Abbildung 15; 4. DEAE-Cell.: Abbildung 16.

bildung 17 ergab einen TonA-Anteil von 19 % des Gesamtproteins. Die vereinigten, aktivsten 3 Fraktionen (88-90) enthielten ins-

gesamt 0.13 mg Protein und hatten eine kinetische spezifische Aktivität von 19900 $ml \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, was einem Anreicherungsfaktor von 119 gegenüber dem Weidel-Rezeptor entspricht. Sie wurden für die im Folgenden beschriebenen kinetischen Untersuchungen verwendet. Eine Übersicht über den gesamten Reinigungsvorgang ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

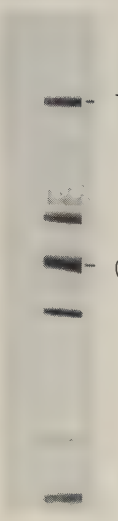

ABBILDUNG 17

Eine weitere Ionenaustauschchromatografie führt zu keiner weiteren Anreicherung, dagegen aber zu erheblichen Verlusten in der Gesamtaktivität. Betrachtet man die Läufe bei 40 °C, so fällt auf, dass mit zunehmender spezifischer Aktivität die Elutionsionenstärke gegen 0.1 Mol/l Natriumchlorid geht. Abbildung 18 veranschaulicht dies. Das bedeutet, dass die elektrophoretische Kontrolle des Reinigungsfortgangs, die zum einen sehr zeitaufwendig ist und zum anderen sehr viel Material verbraucht, erst bei Erreichen dieses Ionenstärkebereichs sinnvoll ist.

Eine sich aus Abbildung 17 aufdrängende Auftrennung nach der Grösse muss zumindest in Aktivitätsschonenden, Triton-haltigen Puffern verworfen werden, da sich die gemischten Mizellen aus den integrierten Membranproteinen und Triton in ihrer Grösse nicht hinreichend unterscheiden (vergl. unten, Abbildung 21, S. 72). Auch eine präparative Elektrophorese, bei der die Proben vor dem Auftragen nicht gekocht werden, und dies gilt sowohl für Triton-haltige als auch für SDS-haltige Systeme, ist ungeeignet, da sich die Trimere vom OmpF-Protein, die atypisch entsprechend 80 000 D im Gel erscheinen (vergl. (66) und (74)), nicht vom TonA-Protein abtrennen lassen.

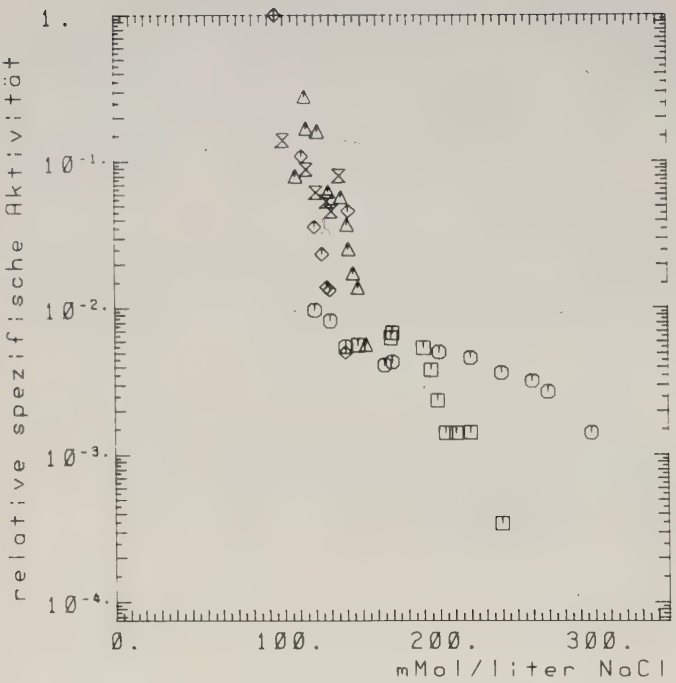

ABBILDUNG 18: Abhängigkeit der Elutionsionenstärke der angereicherten TonA-Präparation bei 40 °C von ihrer Reinheit, ausgedrückt als kinetische spezifische Aktivität KSA (bezogen auf KSA im Maximum der Aktivität von Abbildung 16). Die durch unterschiedliche Symbole gekennzeichneten Werte wurden aus verschiedenen Säulenläufen berechnet.

3.3.3 Eigenschaften der angereicherten TonA-Präparation

3.3.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität SA

In Abbildung 19 sind die Inaktivierungsmessungen zur Bestimmung der spezifischen Rezeptoraktivität wiedergegeben. Verwendet wurde 10 mMol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.8 mit 10 mMol/l Natriumchlorid, 0.02 % Natriumazid und 0.3 % Triton X-100. Die Probe für jede Kurve enthielt 12.4 ng/ml Protein und, ausgehend von $2.04 \cdot 10^9$ PFU/ml, jeweils um den Faktor zwei steigende Phagenkonzentration ($2.04 \cdot 10^9$, $4.09 \cdot 10^9$, $8.17 \cdot 10^9$, $1.63 \cdot 10^{10}$, $3.27 \cdot 10^{10}$ und $6.54 \cdot 10^{10}$ PFU/ml, von unten nach oben). Bei den unteren zwei Kurven war die Phagenkonzentration kleiner als die Rezeptorkon-

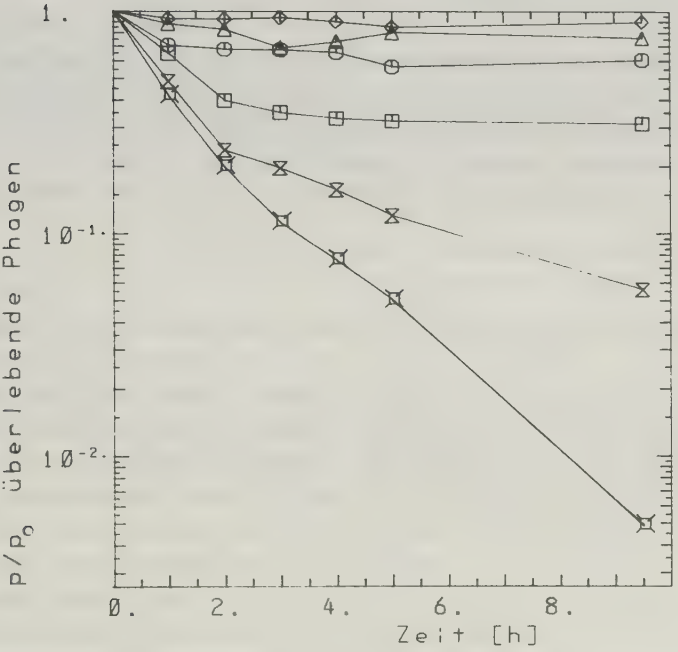

ABBILDUNG 19: Inaktivierungskinetiken zur Bestimmung der spezifischen Rezeptoraktivität SA der angereicherten TonA-Präparation (Beschreibung siehe Text und 2.4.4.4).

zentration (in RU/ml), bei den oberen vier Kurven wurde jeweils das Ende der Reaktion erreicht. Als Mittelwert ergibt sich für die Rezeptorkonzentration $5.55 \cdot 10^9$ RU/ml und für die spezifische Aktivität $4.48 \cdot 10^{14}$ RU/mg. Multipliziert man den Kehrwert der spezifischen Aktivität mit der Avogadroschen Zahl $6.023 \cdot 10^{23}$ RU/Mol, so erhält man eine biologisch bestimmte Molekularmasse von $1.35 \cdot 10^6$ g/Mol. Berücksichtigt man, dass der Anteil an TonA-Protein in der Rezeptorpräparation 19 % ist (vergleiche Abbildung 17), so werden $1.35 \cdot 10^6 \cdot 0.19$ g TonA/Mol oder 3.3 Moleküle TonA/RU benötigt. Ein solcher Wert ist selbstverständlich mit einem sehr grossen Fehler behaftet, wobei die Unsicherheit der Korrelation zwischen Fluram-Proteinbestimmung des Standard-Proteins BSA und den Membranproteinen und die Verwendung des Densitometerscans am stärksten ins Gewicht fallen, während die Rezeptorpartikelzahl dagegen recht genau bestimmt werden konnte (±5 %). Berücksichtigt man die bekannten Streuungen verschiedener Proteinbestimmungsmethoden (z. B. (4)) bei der Bestimmung reiner Proteine, so ist der Wert von 3.3 TonA/RU kaum genauer als ±50 % anzunehmen. Der Wert belegt aber immerhin, dass die gewählte Anreicherungsmethode recht schonend ist und ein Grossteil des gewonnenen TonA-Proteins seine Aktivität behalten hat.

3.3.3.2 Grösse der angereicherten TonA-Protein-haltigen Partikel

Wie am Ende von Abschnitt 3.2.4.5 gefordert wurde, sollten weitere kinetische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Phagen und Rezeptoren möglichst mit Partikeln homogener Grösse durchgeführt werden. Abbildung 20 zeigt einen, entsprechend Abbildung 9, auf Bio-Gel A-1.5m bei 20 °C durchgeführten Säulenlauf. Da für die Inaktivierungsmessungen jedoch nur die Grösse der aktiven Partikel interessiert, wurde in diesem Fall lediglich die Aktivitätsverteilung im Eluat bestimmt. Hierdurch war es möglich auch auf der Säule der Proteinkonzentration der nachfolgenden kinetischen Experimente nahezukommen. Auf die 0.9·56 cm-Säule wurde $1.2 \cdot 10^{-6}$ g Protein in 0.1 ml 10 mMol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.8 mit 10 mMol/l Natriumchlorid, 0.02 %

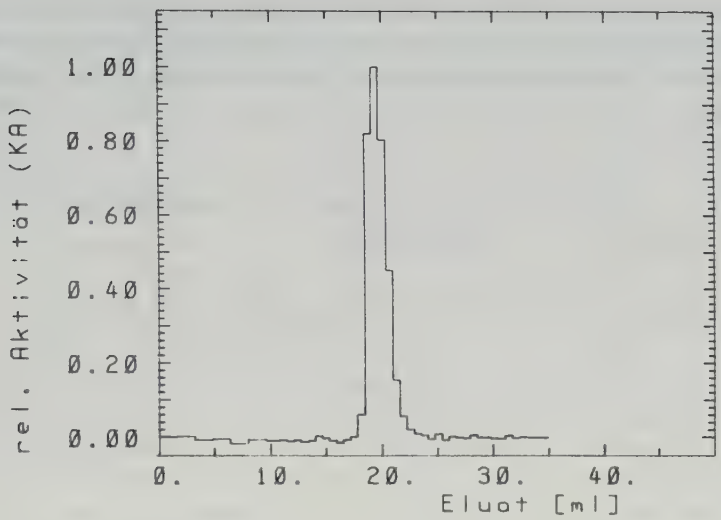

ABBILDUNG 20: Elutionsprofil der Aktivität der TonA-angereicherten Rezeptorpräparation auf Bio-Gel A-1.5m. (Säule: 0.9·56 cm, 20 °C, 2 ml/h, Puffer: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, aufgetragene Menge: $1.2 \cdot 10^{-6}$ g Rezeptorprotein).

Natriumazid und 0.3 % Triton X-100 aufgetragen. Dies entspricht einem Verhältnis von mehr als 100 Triton-Mizellen pro Proteinmolekül. Die Säule war mit dem gleichen Puffer equilibriert. Die Aktivität-tragenden Partikel eluieren homogen wie ein reines Protein.

Zur Grössenbestimmung in Abhängigkeit von der Temperatur wurde eine kalibrierte Ultrogel AcA 34-Säule verwandt (Trennbereich 20 000 - 350 000 D, Abbildung 21). Die Säulenläufe wurden gleich wie in Abbildung 20 durchgeführt. Der dort angegebene Puffer ist der gleiche wie in den im Folgenden beschriebenen kinetischen Experimenten. Es zeigte sich, dass die Partikel auch in dieser Präparation noch eine temperaturabhängige Grössenverteilung aufwiesen: während die Partikel unterhalb von 25 °C homogen blieben, begann das Elutionsmuster darüber inhomogen zu werden. Dass es sich hierbei nicht einfach um den Zerfall eines Komplexes handelt, sondern vielmehr um die Freisetzung von TonA-Protein in

einer Form, in der es mit der Gelmatrix wechselwirken kann, deutet die Tatsache an, dass in den Fraktionen, in denen Proteine um 10 000 D eluiert werden sollten, immer noch Aktivität gefunden wurde. Der Hauptpeak ändert sein Elutionsvolumen mit stei-

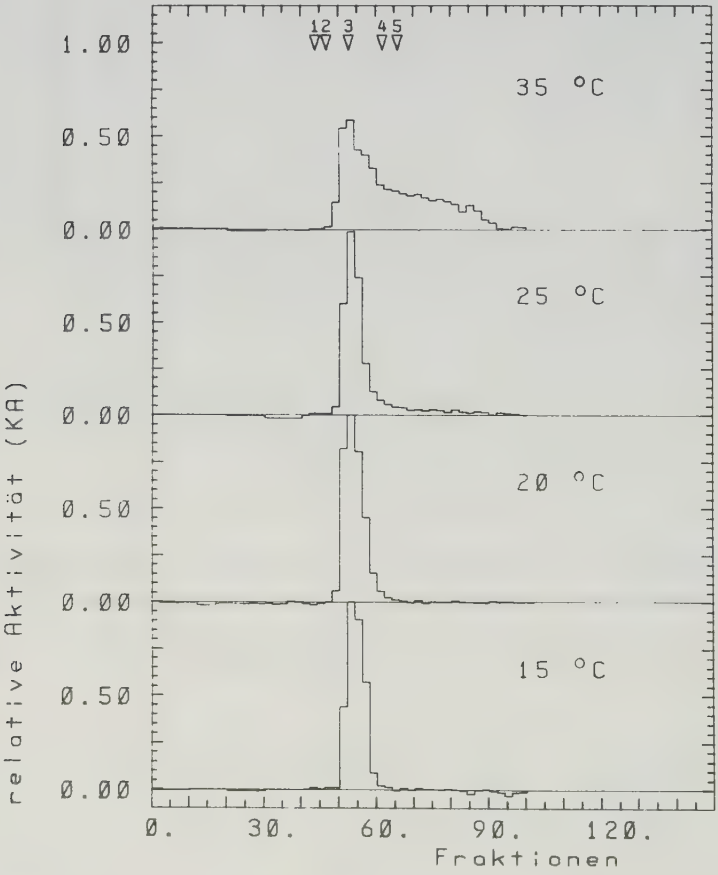

ABBILDUNG 21: Molekülmassenbestimmung der aktiven Partikel auf Ultrogel AcA 34 in Abhängigkeit von der Säulentemperatur. (Säule: 0.9·55 cm, 2 ml/h, 15 Tropfen/Fraktion (ungefähr 0.4 ml), Puffer: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, aufgetragene Menge: $1.2 \cdot 10^{-6}$ g Rezeptorprotein. Die Markierungen bezeichnen die Elutionsvolumina von 1: Dextranblau, 2: Ferritin (440 000 D), 3: Katalase (232 000 D), 4: Rinderserumalbumin (67 000 D) und 5: Ovalbumin (43 000 D)).

gender Temperatur jedoch nicht. Es entspricht einer Molekularmasse von 230 000 D, beziehungsweise einem Stokes-Radius von 4.6 nm (Auswertung erfolgte entsprechend Abbildung 10, nicht gezeigt).

3.4 Thermodynamische Untersuchung der Reaktion von T5-Phagen mit der angereicherten TonA-Protein-Präparation

3.4.1 Kinetik der T5-Phageninaktivierung durch seinen Rezeptor

Inkubiert man den Phagen T5 mit einem Überschuss seines isolierten Rezeptors und misst hierbei den Anteil an überlebenden Phagen p bezogen auf die Menge eingesetzter Phagen p_0, so nimmt dieser zunächst logarithmisch mit der Zeit ab, wie dies für eine irreversible, pseudomonomolekulare Reaktion zu erwarten wäre. Zu diesem Teil der Reaktion wurden bereits von Zarnitz und Weidel (117) thermodynamische Untersuchungen durchgeführt. Verfolgt man die Reaktion jedoch über längere Zeit (bis 10 h), so stellt man fest, dass die logarithmisch aufgetragene Inaktivierungskurve nach einiger Zeit abknickt, um dann wieder linear weiterzulaufen. Diese Abweichung von der irreversiblen, pseudomonomolekularen Reaktion erklären Zarybnicky et al. (120, 121) durch die Annahme eines vorgeschalteten, reversiblen Reaktionsschrittes, sodass der Phage P zunächst reversibel mit dem Rezeptor R zu einem Komplex ⟨PR⟩ reagiert, der irreversibel in einen Komplex [PR] umgewandelt wird. Aus diesem wird in einer oder mehreren Folgereaktionen letztendlich die DNS freigesetzt und der Phagenghost-Rezeptor-Komplex [GR] bleibt zurück (122):

$$P + R \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \langle PR \rangle \xrightarrow{k_3} [PR] \xrightarrow{k_4} [GR] + DNS \qquad (1)$$

Die Änderung der Konzentrationen der einzelnen Komponenten mit der Zeit sind durch das folgende System nicht-linearer Differentialgleichungen beschrieben:

$$dp/dt = -k_1 \cdot p \cdot r + k_2 \cdot \langle pr \rangle \quad (2a)$$

$$d\langle pr \rangle/dt = k_1 \cdot p \cdot r - (k_2 + k_3) \cdot \langle pr \rangle \quad (2b)$$

$$d[pr]/dt = k_3 \cdot \langle pr \rangle - k_4 \cdot [pr] \quad (2c)$$

$$dDNA/dt = k_4 \cdot [pr] \quad (2d)$$

wobei p, r, <pr> und [pr] die Konzentrationen der entsprechenden Komponenten aus Gleichung 1 darstellen. Dieses Differentialgleichungssystem lässt sich normalerweise nur numerisch lösen. Für den Fall jedoch, dass der Rezeptor im grossen Überschuss gegenüber den Phagen vorliegt, die Konzentration des Rezeptors während der ganzen Reaktionszeit also als konstant angesehen werden kann, lässt sich die folgende explizite Lösung ableiten (121):

$$p/p_0 = A_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \quad (3a)$$

$$\langle pr \rangle/p_0 = B_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + B_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \quad (3b)$$

$$[pr]/p_0 = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} - (C_1 + C_2) \cdot e^{-k_4 \cdot t} \quad (3c)$$

$$DNA/p_0 = 1 - k_4 \cdot \left[\frac{C_1}{\lambda_1} \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + \frac{C_2}{\lambda_2} \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} \right] + (C_1 + C_2) \cdot e^{-k_4 \cdot t} \quad (3d)$$

mit

$$\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \left[(k_1 \cdot r_0 + k_2 + k_3) \pm \sqrt{(k_1 \cdot r_0 + k_2 + k_3)^2 - 4 k_1 \cdot r_0 \cdot k_3} \right] \quad (4)$$

und

$$A_1 = \frac{k_1 \cdot r_0 - \lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \qquad A_2 = 1 - A_1 \quad (5a)$$

$$B_1 = \frac{(k_1 \cdot r_0 - \lambda_1)(k_1 \cdot r_0 - \lambda_2)}{k_2 \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \qquad B_2 = -B_1 \quad (5b)$$

$$C_1 = \frac{k_3 \cdot (k_1 \cdot r_o - \lambda_1) \cdot (k_1 \cdot r_o - \lambda_2)}{k_2 \cdot (k_4 - \lambda_1) \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \qquad C_2 = -\frac{k_4 - \lambda_1}{k_4 - \lambda_2} \cdot C_1 \quad . \qquad (5c)$$

Mit Hilfe dieser Lösung lassen sich auf einer Grossrechenanlage mittels eines iterativen Verfahrens, das die Methode der kleinsten Fehlerquadrate benutzt, in wenigen Sekunden die Geschwindigkeitskonstanten k_1 bis k_3 zu einer gemessenen Inaktivierungskurve errechnen. Löst man hierzu die Differentialgleichungen numerisch, ist der Zeitaufwand ungefähr hundertmal grösser. Die Geschwindigkeitskonstante k_4 ist in unserer experimentellen Anordnung mit dieser Methode nicht bestimmbar, auch sind an dieser Stelle mehrere Reaktionsschritte nicht auszuschliessen. Setzt man k_4 gleich 0, vereinfacht sich das Differentialgleichungssystem durch Wegfall der Gleichung (2d) und des Terms $-k_4 \cdot [pr]$ in Gleichung (2c). Letztere Gleichung gibt nun nicht mehr die Änderung der Konzentration des reversibel gebildeten Komplexes [PR] wieder, sondern die Änderung der Konzentration der Summe aller Produkte. Die Wahl des Wertes für k_4 hat keinerlei Einfluss auf die Bestimmung von k_1, k_2 und k_3.

Abbildung 22 zeigt sechs solcher Inaktivierungskurven bei unterschiedlichen Temperaturen. Die mit den Symbolen dargestellten Messwerte stellen die Mittelwerte aus drei, an verschiedenen Tagen durchgeführten, Experimenten dar. Die Reaktion lief in 10 mMol/l Tris-HCl-Puffer pH 7.8 mit 10 mMol/l Natriumchlorid, 0.02 % Natriumazid und 0.3 % Triton ab, der Phagentiter zu Beginn der Reaktion betrug $2.0 \cdot 10^8$ PFU/ml und die Rezeptorkonzentration $3.0 \cdot 10^{10}$ RU/ml. Die ausgezogenen Kurven wurden nach der oben beschriebenen Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2 und k_3 aus diesen berechnet. In Tabelle 4 sind die gefundenen Geschwindigkeitskonstanten und die aus k_1 und k_2 berechneten Gleichgewichtskonstanten K_{12} des reversiblen Reaktionsschrittes im Vergleich zu den in (121) unter gleichen Bedingungen für den Weidel-Rezeptor gefundenen Werten zusammengefasst.

Die Kurven in Abbildung 22 werden durch Gleichung (3a) beschrieben. Dies bedeutet, dass der Kurvenverlauf in der einfach-logarithmischen Darstellung die Summe zweier Geraden darstellt, de-

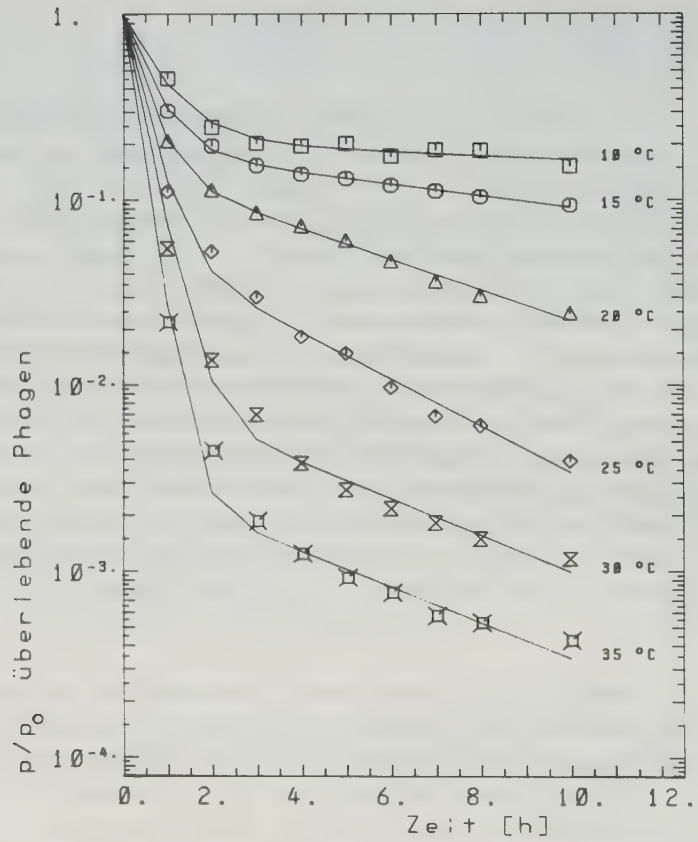

ABBILDUNG 22: Temperaturabhängigkeit der Kinetik der Reaktion zwischen T5-Phagen und der TonA-angereicherten Rezeptorpräparation, durchgeführt in 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, mit $p_o=2\cdot10^8$ PFU/ml und $r_o/p_o=150$ RU/PFU.
Die Symbole bezeichnen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die ausgezogenen Kurven sind das Ergebnis der Einzelanpassungen der Geschwindigkeitskonstanten für jede Temperatur getrennt (aus Tabelle 4).

ren eine, welche die Kurvenform zu Beginn bestimmt, die logarithmische Achse bei A_1 schneidet und die Steigung $-\lambda_1$ hat, während jene, die für den Verlauf nach dem Knick hauptsächlich verantwortlich ist, die Steigung $-\lambda_2$ hat und die Achse bei A_2 schneidet. Durch die komplizierte Form von λ_1 und λ_2 ist Glei-

Tabelle 4

		Temperatur in °C					
		10	15	20	25	30	35
$k_1 \cdot 10^{-6}$ l/(Mol·sec)	(1)	5.68	8.06	10.99	12.84	14.89	20.38
	(2)	2.02	2.66	3.56	4.67	6.05	7.98
	(3)	2.84	4.48	6.93	10.04	13.35	16.92
$k_2 \cdot 10^{6}$ sec^{-1}	(1)	72.56	83.72	79.25	31.83	6.01	2.79
	(2)	22.05	13.79	9.08	5.33	3.37	1.94
	(3)	16.80	17.30	16.50	13.21	3.50	1.09
$k_3 \cdot 10^{6}$ sec^{-1}	(1)	8.87	24.25	61.28	84.61	63.42	61.50
	(2)	67.0	68.3	67.0	67.5	72.7	74.9
	(3)	36.8	33.5	45.2	81.1	84.5	83.7
$K_{12} \cdot 10^{-10}$ l/Mol	(1)	7.83	9.63	13.86	40.31	247.7	729.1
	(2)	9.16	19.3	39.2	87.6	180.	411.
	(3)	16.9	25.9	42.0	76.0	379.	1550.

(1) angereichertes TonA in Anwesenheit von 0.3 % Triton X-100.
(2) Weidel-Rezeptor in Abwesenheit von Triton.
(3) Weidel-Rezeptor in Anwesenheit von 0.3 % Triton X-100.
Die Werte von (2) und (3) sind Grundlage der Berechnungen in (121).

chung (3a) jedoch kaum für eine einfache phänomenologische Beschreibung der Kurvenform geeignet. Da aber in allen unseren untersuchten Fällen sowohl k_2, als auch k_3 klein gegen das Produkt aus k_1 und der Rezeptorkonzentration r_o ist, lässt sich Gleichung (3a) zu Gleichung (6) vereinfachen:

$$p/p_o = A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot r_o \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_3 \cdot t} \qquad (6)$$

sodass die erste Gerade ungefähr die Steigung $-k_1 \cdot r_o$ und die zweite ungefähr die Steigung $-k_3$ erhält. Hierbei wird der Knick in der Kurve umso ausgeprägter, je mehr sich die zwei Steigungen unterscheiden und je grösser k_2 ist.

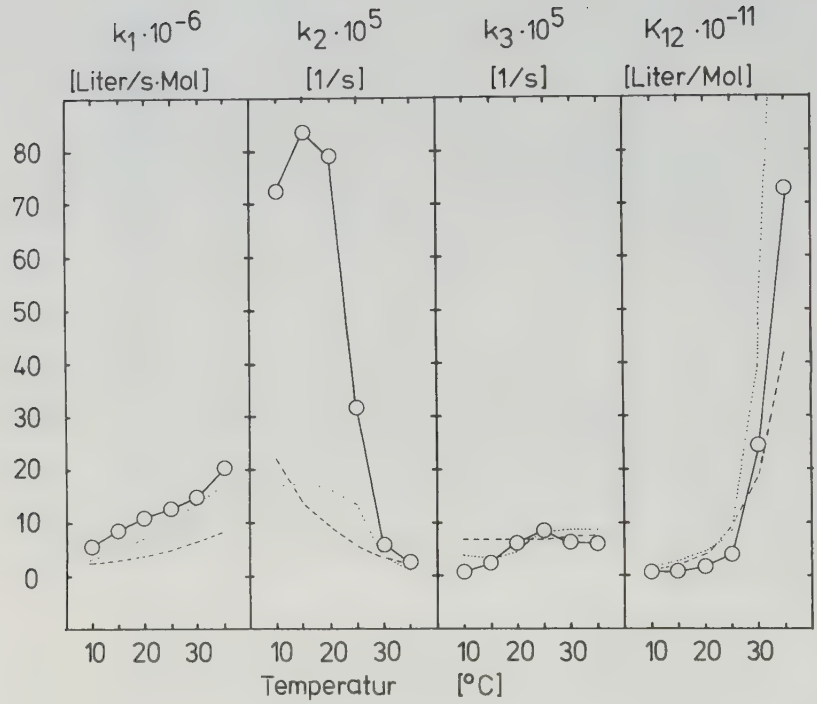

ABBILDUNG 23: Temperaturabhängigkeit der gefundenen Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu den in (121) für den Weidel-Rezeptor in Abwesenheit (gestrichelt) und in Anwesenheit von Triton (punktiert) beschriebenen Werten.

Die Diskontinuität der Temperaturabhängigkeit, insbesondere für k_3, wird so schon bei einfacher Betrachtung der Kurven in Abbildung 22 deutlich. Während in (121) wegen des, bei niedrigen Temperaturen flachen, kaum geknickten Kurvenverlaufs, eine Änderung von k_3 kaum erfasst werden konnte, wird hier ein deutliches Ansteigen von k_3 zwischen 10 und 25 °C erkennbar. Abbildung 23 zeigt die Temperaturabhängigkeit aller Geschwindikeitskonstanten. Gestrichelt unterlegt sind die von uns in (121) gefundenen Werte für den Weidel-Rezeptor in Abwesenheit von Triton und punktiert diejenigen für den Weidel-Rezeptor in Anwesenheit von Triton. Die weitaus bessere Anpassbarkeit der hier gemessenen

Kurven im Bereich zwischen 10 und 20 °C gegenüber (121) ist dem wesentlichen Anstieg von k_2 mit fortschreitender Reinigung des Rezeptorproteins zu verdanken (Fehler E (vergleiche (121)) 10 °C: 0.036, 15 °C: 0.014, 20 °C: 0.032). Selbstverständlich schlägt sich hierin auch die mit Abbildung 21 belegte Grössenkonstanz der Rezeptorpartikel in diesem Temperaturbereich nieder. Im oberen Temperaturbereich, wo es zu der deutlichen Änderung im Grössenverhalten kommt, sind die Kurven sehr viel weniger gut anpassbar (Fehler E 25 °C: 0.068, 30 °C: 0.088, 35 °C: 0.103).

3.4.2 Thermodynamische Auswertung

Nach der ursprünglich von Eyring (28) entwickelten thermodynamischen Transition-State-Theorie sind die Geschwindigkeitskonstanten k_i einer Reaktion bestimmt durch die Aktivierungsenthalpie $\Delta H_i^{\ddagger}$ und die Aktivierungsentropie $\Delta S_i^{\ddagger}$:

$$k_i = \frac{k \cdot T}{h} \cdot e^{\Delta S_i^{\ddagger}/R} \cdot e^{-\Delta H_i^{\ddagger}/R \cdot T} \qquad (7)$$

wobei h die Plancksche Konstante, k die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und R die Gaskonstante ist. Diese Gleichung lässt sich durch Logarithmieren in die Geradengleichung

$$\ln \frac{k_i}{T} = \frac{\Delta S_i^{\ddagger}}{R} \cdot \ln \frac{k}{h} - \frac{\Delta H_i^{\ddagger}}{R \cdot T} \qquad (7a)$$

umformen, die, wenn man $\ln(k_i/T)$ gegen $1/(RT)$ aufträgt, die Steigung $-\Delta H_i^{\ddagger}$ und den Achsenabschnitt $(\Delta S_i^{\ddagger}/R) \cdot \ln(k/h)$ hat, sodass man aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten sowohl die Aktivierungsenthalpie, als auch die Aktivierungsentropie bestimmen kann.
Trägt man die gefundenen Geschwindigkeitskonstanten in dieser Weise auf (Abbildung 24), so zeigt sich, wie auch schon für den Weidel-Rezeptor beschrieben (121), dass die lineare Beziehung

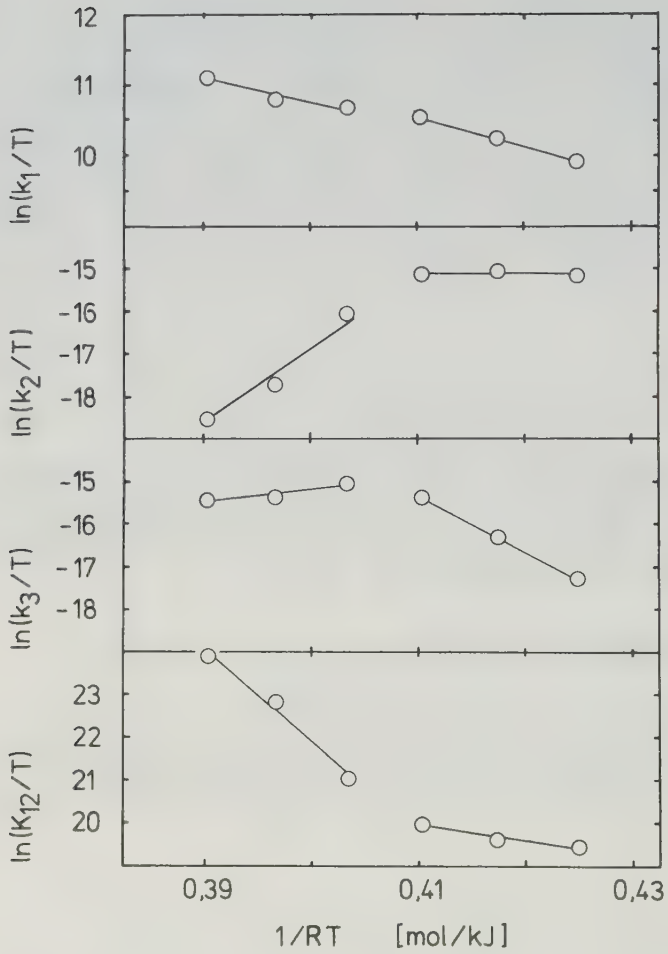

ABBILDUNG 24: Zur Bestimmung der thermodynamischen Daten, entsprechend Gleichung (7a) aus den gefundenen Geschwindigkeitskonstanten.

nicht im ganzen untersuchten Temperaturbereich gilt. Es drängt sich vielmehr eine Zweiteilung in einen Bereich von 10 bis 20 °C und einen von 25 bis 35 °C auf, wobei die Schnittpunkte der Geraden für alle drei Geschwindigkeitskonstanten und auch für die Gleichgewichtskonstante des reversiblen Reaktionsschrittes zwi-

schen 20 und 25 °C liegen. Dies ist genau derjenige Temperaturbereich, in dem nach Abbildung 21 die Homogenität der Grösse der Rezeptorpartikel schlechter zu werden beginnt. Tabelle 5 fasst die gefundenen thermodynamischen Konstanten im Vergleich zu den für den Weidel-Rezeptor mit und ohne Triton in (121) gefundenen Werten zusammen.

Tabelle 5

	anger. TonA	Weidel + T	anger. TonA	Weidel + T	Weidel
	10 - 20 °C	10 - 20 °C	25 - 35 °C	25 - 35 °C	10 - 40 °C
ΔH_1^*	43.2 ± 1.2	57.8 ± 2.4	32.7 ± 7.7	37.4 ± 1.0	37.5 ± 0.4
ΔH_2^*	3.8 ± 7.8	-4.1 ± 2.6	-188.7 ± 38.0	-194.5 ± 8.4	-72.9 ± 1.4
ΔH_3^*	131.0 ± 1.8	14.5 ± 15.3	-27.0 ± 11.2	0.1 ± 2.4	0.5 ± 0.8
ΔS_1^*	37.4 ± 4.1	83.6 ± 8.3	0.7 ± 25.3	14.6 ± 3.4	8.7 ± 1.3
ΔS_2^*	-310.0 ± 27.2	-350.2 ± 8.8	-965.1 ± 125.4	-991.0 ± 27.8	-590.3 ± 4.8
ΔS_3^*	121.5 ± 6.3	-279.1 ± 53.0	-413.7 ± 36.7	-322.8 ± 7.7	-322.8 ± 2.6
ΔG_1^*	31.7 ± 2.4	32.1 ± 5.0	32.5 ± 15.4	32.9 ± 2.1	34.8 ± 0.8
	32.2	33.3	32.5	33.1	35.0
ΔG_2^*	99.3 ± 16.2	103.8 ± 5.3	108.7 ± 76.7	110.8 ± 17.0	109.1 ± 2.9
	94.7	98.6	94.2	96.1	100.2
ΔG_3^*	93.5 ± 3.7	100.5 ± 31.6	100.5 ± 22.4	99.6 ± 4.7	99.9 ± 1.6
	95.4	96.3	94.3	94.7	95.1
ΔH_{12}	39.4 ± 6.7	61.9 ± 0.1	221.4 ± 30.4	231.9 ± 9.5	110.4 ± 1.7
ΔS_{12}	347.3 ± 23.2	433.8 ± 0.5	956.9 ± 125.4	1005.3 ± 31.3	599.0 ± 5.6
ΔG_{12}	-67.7 ± 13.8	-71.8 ± 0.3	-76.2 ± 61.2	-78.0 ± 19.1	-74.2 ± 3.4
	-62.5	-65.2	-61.5	-62.8	-65.2

Die Dimension der Enthalpien und der Gibbsschen freien Energien ist kJ/Mol, die der Entropien J/(K·Mol).
anger. TonA: angereichertes TonA-Protein in Anwesenheit von 0.3 % Triton.
Weidel + T : Weidel-Rezeptor in Anwesenheit von 0.3 % Triton.
Weidel : Weidel-Rezeptor in Abwesenheit von Triton.
Die Werte zu den Spalten 'Weidel + T' und 'Weidel' sind (121) entnommen.
Bei den Gibbsschen freien Energien ist der obere Wert für 35 °C und der untere für 20°C berechnet.

In einer Variante des Rechnerprogramms zur Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten besteht auch die Möglichkeit, die sechs

Parameter $\Delta H_1^{\ddagger}$, $\Delta H_2^{\ddagger}$, $\Delta H_3^{\ddagger}$, $\Delta S_1^{\ddagger}$, $\Delta S_2^{\ddagger}$ und $\Delta S_3^{\ddagger}$ direkt aus den Messpunkten mehrerer Inaktivierungskurven bei unterschiedlichen Temperaturen zu errechnen. Das Ergebnis dieser gemeinsamen Anpassung für jeweils drei Temperaturen ist in den ausgezogenen Geraden in Abbildung 24 dargestellt. Dass die Berechnung auf diese Weise zu exakt dem gleichen Ergebnis führt wie die lineare Regression durch die Geschwindigkeitskonstanten entsprechend Gleichung (7a), ist ein Beleg für die gute Korrelation der Mess-

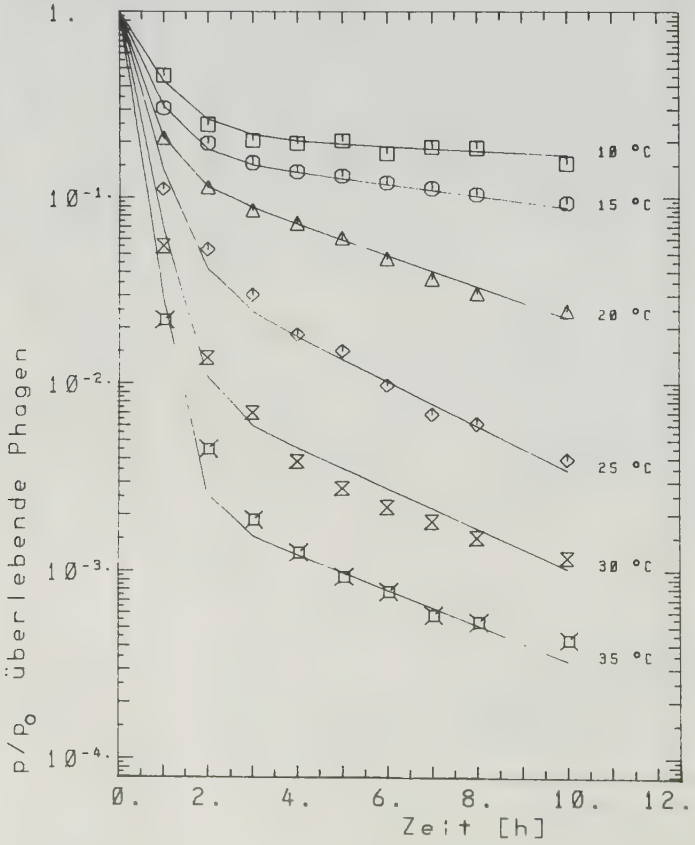

ABBILDUNG 25: Gemeinsame Anpassung der Kurven an die Messpunkte aus Abbildung 22 zur direkten Bestimmung der thermodynamischen Konstanten (für die Temperaturbereiche von 10 - 20 und von 25 - 35 °C getrennt berechnet).

werte mit der Theorie.
Berechnet man aus den thermodynamischen Daten der gemeinsamen Anpassungen die Geschwindigkeitskonstanten bei den verschiedenen Temperaturen und hieraus wiederum die überlebenden Phagen p/p_o in Abhängigkeit von der Zeit, so erhält man die in Abbildung 25 gegen die Messwerte von Abbildung 22 aufgetragenen Kurven für die gemeinsame Anpassung. Auch diese Kurven passen sehr gut zu den Messwerten.

3.4.3 Einfluss von Lipopolysaccharid

In der angereicherten TonA-Protein-Präparation lässt sich Lipopolysaccharid mittels der KDO-Methode (2.4.2.3) nicht mehr nachweisen. Ob LPS jedoch während der Ionenaustauschchromatografie (insgesamt über 100 h bei 40 °C) vollständig abgetrennt wurde, oder ob einige wenige LPS-Moleküle pro TonA-Molekül zurückgeblieben sind, lässt sich nicht entscheiden.
Abbildung 26 zeigt die DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie des bereits für Abbildung 8 verwendeten, mittels ^{14}C-Proteinhydrolysat und ^{3}H-Glucose doppelt markierten Weidel-Rezeptors bei 20 °C und bei 40 °C. Hierin wird noch einmal deutlich, dass es bei 40 °C zu einer besseren Aufspaltung der Partikel kommt, dass jedoch auch hier nicht alles LPS vom Protein freigesetzt werden kann. Das Auftreten scharfer LPS-Peaks weist auf recht spezifische Wechselwirkungen von LPS mit Proteinen hin wie dies auch aus der Literatur bekannt ist (21, 34, 74, 92). Reines LPS wird in einer solchen Ionenaustauschchromatografie zum allergrössten Teil an die Cellulose gebunden und wider Erwarten über den ganzen Gradienten verteilt eluiert (nicht gezeigt). Da insbesondere dort, wo bei der erhöhten Temperatur die freigesetzte Aktivität erscheint (vergleiche Abbildung 14) ebenfalls LPS eluiert wird, muss neben möglichen Wechselwirkungen des TonA-Proteins mit LPS mit einer verschleppten Kontamination des Rezeptors mit demselben gerechnet werden.
Setzt man einem kinetischen Experiment entsprechend Abbildung 22 LPS zu, kommt es zu einer deutlichen Verlangsamung der Inaktivierung (Abbildung 27). Hierbei wurde die LPS-Konzentration so

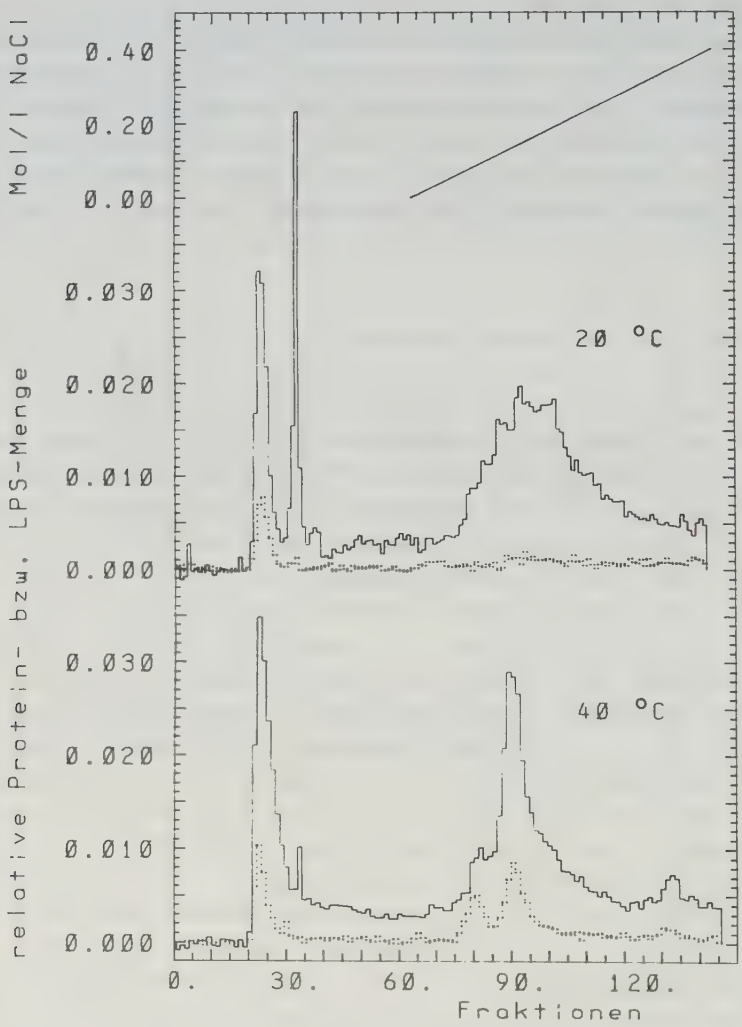

ABBILDUNG 26: Analytische DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie eines ^{3}H-Glucose-^{14}C-Proteinhydrolysat-doppelmarkierten Weidel-Rezeptors bei 20 °C und bei 40 °C. (Säule: 0.9·60 cm, 2 ml/h, Puffer: 10 mMol/l Phosphat-Puffer pH 7.0, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, mit NaCl-Gradient eluiert (oben); aufgetragene Menge: 0.05 mg Rezeptorprotein, ^{3}H punktiert, ^{14}C ausgezogen).

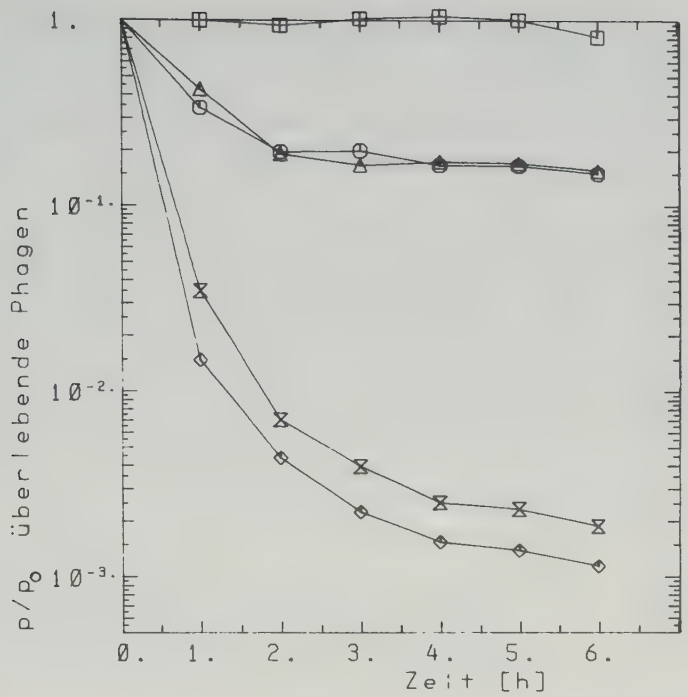

ABBILDUNG 27: Einfluss von LPS auf die Inaktivierungskinetik von T5-Phagen durch angereichertes TonA-Protein. (Puffer: 10 mMol/l Tris-HCl pH 7.8, 10 mMol/l NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.3 % Triton, $p_o=2\cdot10^8$ PFU/ml, $r_o/p_o=150$ RU/PFU. ☐ : Kontrolle ohne LPS und Rezeptor 35 °C, ⊙ : ohne LPS 15 °C, △ : mit LPS (1.2 mg/ml) 15 °C, ◇ : ohne LPS 35 °C, ⧗ : mit LPS 35 °C).

gewählt, dass bei angenommener Bildung von gemischten Mizellen aus LPS und Triton ungefähr 10 LPS-Moleküle pro Triton-Mizelle zur Verfügung standen. Während es bei 15 °C anscheinend nur am Anfang zu einer Änderung kommt, überleben bei 35 °C durch den LPS-Zusatz während der ganzen gemessenen Zeit ungefähr 1.7mal mehr Phagen als in der Probe ohne LPS. Mathematische Anpassungen der Kurven bei 35 °C ergeben, dass durch die Zugabe von LPS das Produkt aus k_1 und r_o um 23 % erniedrigt wird. Die Konstante k_2 bleibt, soweit man dies aus einer Messung sagen kann, gleich. Wie schon aus der Kurvenform zu ersehen ist, ändert sich auch k_3 nicht. Entsprechendes gilt, allerdings mit wesentlich grösserer

Unsicherheit behaftet, für die Kurven bei 15 °C. Hier ist $k_1 \cdot r_o$ um 26 % erniedrigt.

4. DISKUSSION

4.1 Der Weidel-Rezeptor als Reaktionspartner des Phagen T5 - Ein in vitro-Modellsystem -

Für die thermodynamische Untersuchung einer Reaktion ist es notwendig, die Reaktionspartner in einer genau definierten chemischen Umgebung miteinander reagieren zu lassen. Mögliche Wechselwirkungen mit weiteren Reaktionspartnern können zu Fehlinterpretationen führen welche ein betrachtetes System komplizierter scheinen lassen als es ist. Bei der Messung biologischer Reaktionen, insbesondere wenn ein Reaktionspartner wie bei uns ein Membranbestandteil ist, ist dieses Ziel nur schwer zu erreichen. Zum einen ist die Reinigung der Reaktionspartner nicht immer vollständig möglich und zum anderen ist die Konformation von Membranbestandteilen sehr stark von deren chemischer Umgebung abhängig, sodass ein vollständig isoliertes System auch zu unsinnigen Ergebnissen führen kann. Es ist deshalb für die Untersuchung solcher Reaktionen mit zunehmend gereinigten Membranbestandteilen unabdingbar, die Resultate immer wieder an einem, wenn auch komplizierter aufgebauten Modellsystem zu messen, welches den in vivo-Verhältnissen relativ nahe steht. Das der lebenden Zelle am nächsten stehende System wäre eine Präparation von äusserer Membran. Diese ist jedoch für ein in vitro-Modell unbefriedigend, da 1. die Grösse der Membranvesikel sehr heterogen ist, diese 2. eine streuende, nur ungenau bekannte Zahl von Rezeptor-sites pro Partikel tragen und es 3. während der notwendigen Inkubation über mehrere Stunden zur Sedimentation dieses Reaktionspartners käme. Für die kinetischen Messungen in (120) und (121) wurde deshalb das von Weidel et al. (113) beschriebene, bis zu konstanter Grösse gereinigte, Rezeptorpartikel verwendet (Abbildung 5, S. 46). Wie EM-Bilder zeigen, vermag jedes Rezeptorpartikel auch bei Phagenüberschuss nur einen Phagen zu binden (112, 121, Zarybnicky unveröffentlicht).
Die Partikel sind mit ungefähr $47 \cdot 10^6$ D (3.2.3, S. 47) klein genug, um sedimentationsbedingte Artefakte in der Kinetik auszuschliessen. Der diesem Molekulargewicht entsprechende Durch-

messer von ungefähr 46 nm würde es zulassen, dass es sich beim Rezeptorpartikel um ein aus Bestandteilen der äusseren Membran gebildetes Vesikel handelt. Elektronenmikroskopische Bilder von Ultradünnschnitten liegen hierzu jedoch nicht vor.

Die in dieser Arbeit beschriebene Zusammensetzung der Rezeptorpartikel ähnelt sehr derjenigen der äusseren Membran (3.2.1, S. 41). Das Proteinmuster in der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lugtenberg (Abbildung 4, S. 43) ist allerdings etwas weniger komplex als das einer äusseren Membranpräparation nach Osborn, wobei das Rezeptorprotein TonA angereichert ist.

Man kann annehmen, dass die chemische Umgebung des TonA-Proteins in diesen Partikeln weitgehend derjenigen in der kompletten äusseren Membran entspricht. Allerdings scheint das gesamte Lipopolysaccharid dieser Partikel in einer Form vorzuliegen, die für den Phagen T4 unzugänglich ist. Dies ist besonders deshalb erstaunlich, weil die Bindestelle des Phagen T4 sehr weit aussen am Core des Lipopolysaccharids liegt (23). Isoliert man das LPS aus dem Rezeptor (113) oder aus den, nach der T5-Rezeptorextraktion zurückbleibenden Zellresten (3.2.1.1, S. 44), so hat es volle T4-Inaktivierungsfähigkeit. Dies schliesst aus, dass das LPS während der T5-Rezeptorpräparation chemisch modifiziert wurde. Wenn der Core-Oligosaccharid-Anteil des LPS aber nicht, wie es nach den heutigen Kenntnissen der Membranbiologie höchst unwahrscheinlich wäre, im Inneren der Partikel angeordnet ist (s. (111)), muss es hier neben den Wechselwirkungen des Lipids A mit anderen Membranbestandteilen, die bereits häufiger beobachtet wurden (Übersicht in (74)), auch zur Bindung des Oligosaccharids an andere Bestandteile kommen. Solche Bindungen wurden zum Beispiel für das OmpC-Protein gefunden (116). Sie bewirken bei E. coli K12, dass dessen, nur wenig von dem des Stammes B verschiedenes LPS, welches allein keine T4-Phagen zu inaktivieren vermag, von diesem Phagen erkannt werden kann (30, 45, 65).

Alles in allem scheint es gerechtfertigt, den Weidel-Rezeptor als ein, dem nativen Zustand recht nahestehendes in vitro-Modell zu verwenden und dessen Eigenschaften als Referenz für die kinetische Untersuchung weiter gereinigten oder aus seiner natürlichen Umgebung herausgelösten Rezeptorproteins zu verwenden. Es

muss an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen werden, dass etwaige Auswirkungen einer Konformationsänderung, die in vivo durch die Verknüpfung des TonA-Proteins mit der energetisierten Cytoplasmamembran über das tonB-Genprodukt möglich ist, wie sie von Braun et al. (8, 39) wegen der energieabhängigen, ebenfalls durch das TonA-Protein vermittelten Aufnahme von Ferrichrom und Colicin M diskutiert werden, für unsere Versuche verloren sind.

Die Behandlung des Rezeptors mit Trypsin und Thermolysin (3.2.5, S. 57) führt nicht zur Abspaltung eines aktivitätstragenden Bruchstückes vom TonA-Protein. Ob ein solches Bruchstück überhaupt nicht gefunden werden kann, lässt sich aus der geringen Zahl der hier untersuchten Enzyme selbstverständlich nicht entscheiden. Es fällt jedoch auf, dass bei beiden Enzymen und auch bei Pankreatin (3.2.1, S. 44) die spezifische Aktivität des zurückbleibenden Rezeptors erhöht ist. Nimmt man hinzu, dass sich die Bindestellen des TonA-Proteins für seine verschiedenen Substrate (s.o.) weitestgehend zu überlappen scheinen (39, 50), so legt dies nahe, dass nur ein sehr kleiner Bereich des Proteins an der Oberfläche des Rezeptors bzw. des Bakteriums zugänglich ist. Dies würde bei der Grösse des TonA-Moleküls von 78 000 D die These stützen, dass es sich hierbei um ein transmembranes Protein handelt. Auch die Rezeptoreigenschaft für Phagen oder andere Substrate an sich wird als Indiz für transmembrane Proteine gewertet (25). Ein solcher Schluss ist aber nicht zwingend, da ein Membranbaustein, welcher für die primäre Bindung verantwortlich gemacht wird, nicht notwendig auch an der Translokation des Substrats oder von Teilen von ihm durch die Membran beteiligt sein muss.

4.2 Der Weidel-Rezeptor in Triton X-100-haltigen Puffern

Nichtionische Detergentien wie Triton X-100 werden, da sie Membranproteine unter Erhalt ihrer tertiären Struktur schonend zu lösen vermögen, häufig zur Spaltung von biologischen Membranen verwendet. Gibt man zu einer Membran steigende Mengen von Detergens, so wird dieses zunächst in die Membran integriert. Da-

rauffolgend kommt es zur Bildung kleinerer Bruchstücke, aus denen die Lipide bei weiterem Detergens-Zusatz aufgrund des Verteilungsgleichgewichtes zwischen den Membranaggregaten und den Detergensmizellen letztendlich herausgelöst werden (41, 58, 84). Entsprechend werden auch die integrierten Membranproteine als amphiphile Moleküle in die Detergensmizellen eingebaut. Inwieweit die Trennung aller Membranbestandteile voneinander gelingt, hängt vom gewählten Detergens, dem Puffer, der Temperatur und vor allem von der Festigkeit spezifischer intermolekularer Wechselwirkungen in der Membran ab.

In den Kapiteln 3.2.4.1 bis 3.2.4.5 wurde das Verhalten des 'Weidel-Rezeptor' genannten Membranbruchstückes in Triton X-100-haltigen Lösungen untersucht. Dies sollte zum einen der Klärung der unterschiedlichen Kinetik-Ergebnisse in (121) in An- und Abwesenheit von Triton und zum anderen als Baustein im Bild der Wechselwirkungen von Bestandteilen der äusseren Membran gramnegativer Bakterien dienen.

Die Spaltung der Rezeptorpartikel durch Triton ist nicht sehr effektiv (Abbildung 7, S. 51). Bei 15 °C reicht eine Menge von ungefähr 2 Tritonmizellen pro Membranproteinmolekül aus, um die maximale Spaltung zu erreichen (vergleiche Abbildung 7c: 2 Mizellen/Molekül und Abbildung 8 oben: 6 Mizellen/Molekül). Da bei vollständiger Spaltung an jedes Proteinmolekül ungefähr die Tritonmenge einer Mizelle gebunden wird (bei Raumtemperatur etwa 100 000 D), wären Komplexe mit maximal 200 000 bis 300 000 D zu erwarten (58), der hier gefundene Bereich erstreckt sich aber bis ans Ausschlussvolumen der Säule von $>1.5 \cdot 10^6$ D (für die Molekülmassen, vergleiche Abbildung 10).

Erhöht man die Temperatur (Abbildung 9c), so wird der weitaus grösste Teil im erwarteten Bereich vollständiger Spaltung eluiert. Dass der Effekt so deutlich ausfällt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier die Phasenübergangstemperatur der Membran überschritten wurde, wodurch die Moleküle wegen der grösseren Beweglichkeit leichter von der Membranphase in die Detergensphase überwechseln können. Die komplette äussere Membran hat ihren Phasenübergang zwischen 19 und 37 °C (17), reines Lipopolysaccharid aus E. coli B zeigt einen scharfen Übergang bei

25 °C (69). Wie Abbildung 9d zeigt, ist diese Temperaturabhängigkeit der Aufspaltung in gewissen Grenzen reversibel.
Das Triton-Rezeptor-System reagiert sehr empfindlich auf den Zusatz von Natriumchlorid (Abbildung 6, S. 49). Die beste Aufspaltung wurde im Bereich um 50 mMol/l gefunden. Der Effekt gleicht dem für lösliche Proteine bekannten Einsalzen bei niederen Ionenstärken, dem bei weiterem Salzzusatz ein Aussalzen folgt. Ein Grossteil dieses Verhaltens beruht aber auf der Empfindlichkeit der Triton-Mizellen auf Salzzusatz, die sich in der veränderten Hydratation der Polyoxyethylen-Reste auswirkt. Gemessen mit Natriumsulfat hat die Hydratation der Polyoxyethylen-Reste bei einer Ionenstärke um 150 mMol/l ihr Maximum ((59), vergleiche auch 3.3.1, S. 62: Cloud Point und (68)).
Die Wechselwirkungen zwischen dem Lipid A des Lipopolysaccharids und Membranproteinen sind für viele Proteine beschrieben worden (74). Sie scheinen unter anderem an dem geordneten Zusammenbau der äusseren Membran beteiligt zu sein. Auch diese Wechselwirkungen lassen sich durch Triton nur sehr unvollständig auflösen (Abbildung 8). Der geringe Einfluss von EDTA zeigt, dass hier die ionischen Verknüpfungen der LPS-Moleküle durch divalente Kationen nur in geringem Masse ins Gewicht fallen. Die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C vermag die spezifischen Bindungen zwischen LPS und Proteinen ebenfalls nicht völlig aufzubrechen (Abbildung 26, S. 84 und 3.2.4.4, S. 52). Dies passt zu den Ergebnissen von Datta et al. (21), die beschreiben, dass aus einem Komplex aus Protein Ia, Ib, Murein und Lipoprotein selbst mit SDS bei 60 °C (87) nicht alles LPS entfernt werden kann.
Es ist verständlich, dass die Summe der intermolekularen Wechselwirkungen der Membrankomponenten auch der Temperaturerhöhung widersteht, denn das Bakterium war unter dem Evolutionsdruck seiner natürlichen Umgebung, des Darmes, gezwungen, eine äussere Hülle zu entwickeln, die ihm bei 37 °C und in Anwesenheit der Gallen-´Detergentien´ zu leben ermöglicht.

4.3 Anreicherung von TonA-Protein

Die Kinetik der T5-Inaktivierung zeigt in Anwesenheit von Triton eine diskontinuierliche Temperaturabhängigkeit (121). Um die Ursache dieses Verhaltens zu klären wurde das Rezeptorprotein weiter gereinigt. Es bestand die Möglichkeit, dass die Diskontinuität der Temperaturabhängigkeit durch den, bei einer bestimmten Temperatur zwischen 20 und 25 °C auftretenden Verlust eines Cofaktors der Inaktivierung verursacht werden könnte. Deshalb, und selbstverständlich auch wegen der deutlich besseren Aufspaltung der Rezeptorpartikel, wurde auf die Reinigung bei erhöhter Temperatur Wert gelegt. Sie bringt eine ungefähr 120fache Anreicherung des TonA-Proteins relativ zum Weidel-Rezeptor und ist sehr schonend. Insbesondere die Proteine ähnlicher Grösse, welche im Weidel-Rezeptor gegenüber der äusseren Membran angereichert sind, wurden sehr gut abgetrennt (vergleiche Abbildungen 4 und 17). Angewandt auf Bakterien, die, bedingt durch Transformation mit tonA-haltigen Plasmiden (79), das Genprodukt bereits in der Membran angereichert enthalten, sollte diese Methode zu recht guten Erfolgen führen.

4.4 Eigenschaften der TonA-Protein-Präparation

Die mittels der DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie bei 40 °C erhaltene angereicherte TonA-Präparation enthält knapp 20 % TonA-Protein (3.3.2, S. 65). Aus dieser Zahl und der spezifischen Aktivität SA (3.3.3.1, S. 69) lässt sich berechnen, dass ungefähr 3 TonA-Moleküle pro Rezeptoreinheit RU benötigt werden. Unabhängig hiervon wurde für die erhaltenen aktiven Partikel unterhalb von 25 °C eine Masse von 230 000 D gefunden (3.3.3.2, S. 70). Nimmt man diese Ergebnisse zusammen, so bieten sich drei Beschreibungen des Rezeptorpartikels an, unter denen allerdings eine Entscheidung nicht möglich ist, solange nicht das vollständig gereinigte TonA-Protein in ausreichender Menge vorhanden ist:

1. könnte das Rezeptorpartikel immer noch aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sein. Ein solches Aggregat könnte, je

nach Grad der gegenseitigen Absättigung der hydrophoben Bindestellen seiner Komponenten, mehr oder weniger Triton gebunden haben. Es müsste, wegen des scharfen Elutionspeaks in den Abbildungen 20 und 21 (S. 71 und 72) und wegen der Präparationsbedingungen, reversibel, mit genau definierter, auf spezifischen Wechselwirkungen beruhender Zusammensetzung gebildet werden.

2. wäre die Bildung eines TonA-Trimers (234 000 D) denkbar. Auch hier müssten die hydrophoben Bindestellen durch intermolekulare Wechselwirkungen abgesättigt werden, sodass nur wenig Triton gebunden wäre. Diese Hypothese würde zu den oben genannten drei TonA-Molekülen pro RU passen, wenn man annimmt, dass alles erhaltene TonA-Protein noch aktiv ist.
3. könnte ein einzelnes TonA-Molekül in eine Triton-Mizelle eingebaut worden sein, wie dies in der Regel für integrierte Membranproteine bei vollständiger Solubilisierung beobachtet wird. Hier sollte man eine Partikelmasse zwischen 150 000 und 250 000 D finden.

Die Temperaturabhängigkeit des Elutionsmusters der Aktivitätstragenden Partikel (Abbildung 21) zeigt, dass es bei zunehmender Temperatur zwischen 20 und 25 °C zu einer Änderung kommt, die sich in einer kontinuierlichen Verbreiterung des Aktivitätspeaks zu kleineren Molekülmassen ausdrückt. Bei einem Partikel, welches weitgehend von den Eigenschaften einer Triton-Mizelle bestimmt ist, würde man ein Grösserwerden der Partikel mit steigender Temperatur erwarten (vergleiche (75)). Dies ist hier nicht der Fall. Da Aktivität auch in Fraktionen gefunden wird, deren Elutionsvolumen Proteinen von weniger als 10 000 D entspräche, handelt es sich bei der Änderung nicht einfach um den Zerfall heterogener Partikel. Vielmehr werden Bindestellen am Rezeptorprotein zugänglich, die zu Wechselwirkungen mit der Gelmatrix (Polyacrylamid mit Agarose) Anlass geben, sodass hierdurch die Möglichkeiten 2 und 3 nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Kinetik der Reaktion zwischen T5-Phagen und der angereicherten TonA-Präparation

Der glückliche Umstand, in dem Phagen die sich nur langsam ändernde Konzentration eines reagierenden Partikels über mehrere Zehnerpotenzen verfolgen zu können, versetzt uns in die Lage, die ersten zwei Schritte einer komplizierten Reaktion kinetisch zu analysieren. Dies macht das untersuchte System neben dem direkt interessierenden Vorgang der Infektion eines Bakteriums durch einen Phagen auch zu einem Modell für die chemische Reaktionskinetik.
Während der fortschreitenden Reinigung eines Membranproteins ändert sich dessen chemische Umgebung und in unserem Falle vor allem die Grösse des Rezeptorpartikels. Untersuchungen, wie sie hier beschrieben werden, dienen der Klärung, welche Bestandteile der Membran für den komplexen Vorgang der Phageninaktivierung verantwortlich sind und ob der mehrstufige Prozess sich in Teilschritte unterteilen lässt, an denen unterschiedliche Reaktionspartner beteiligt sind. Hierbei kann es neben der Abtrennung von an der Reaktion beteiligten Partnern auch zu geringfügigen Konformationsänderungen im Rezeptorprotein kommen, welche die eigentliche Rezeptorfunktion nicht beeinträchtigen, sich aber in der Kinetik auswirken. Dies gilt besonders für Messungen in Detergens-haltigen Lösungen, die gerade bei unterschiedlichen Temperaturen zusätzliche Unsicherheiten einbringen. Deshalb ist es notwendig, als Referenz solcher Experimente, kinetische Messungen eines, dem in vivo-Verhältnissen recht nahestehenden, Systems zur Verfügung zu haben. Als solche Referenz werden hier die in (121) beschriebenen Experimente mit dem Weidel-Rezeptor in Abwesenheit von Triton verwendet (s.o.).
Geht man davon aus, dass mit zunehmender Reinigung nur die Grösse des reagierenden Partikels abnimmt und es zu keiner Konformationsänderung kommt, was für solche Untersuchungen den Idealfall darstellte, so würde sich, bedingt durch die erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit und den relativ grösseren Anteil des Rezeptorproteins an der Gesamtoberfläche, lediglich die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Zusammenstosses der beiden Reaktanden und somit die Geschwindigkeitskonstante k_1 erhöhen. Ein Blick

auf Tabelle 4 (S. 77) belehrt uns, dass dieses zutrifft, dass sich aber auch die anderen Geschwindigkeitskonstanten geändert haben und eine geringfügige Konformationsänderung also nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei der Inaktivierung von Phagen durch ganze Bakterien wurde gefunden, dass die Geschwindigkeitskonstanten im Bereich des 0.1- bis 0.6-fachen des diffusionsbedingten Maximums liegt (21, 82, 101, 115). Die Obergrenze der Geschwindigkeitskonstanten erhält man unter der Annahme, dass jeder Zusammenstoss zweier Partikel zur Reaktion führt, aus der z. B. in (37) angegebenen Formel:

$$k_{max} = 4 \cdot \pi \cdot N_A \cdot (D_1 + D_2) \cdot (r_1 + r_2) \qquad (8)$$

in der die Diffusionskonstanten D durch $D = k \cdot T/(6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r)$ ersetzt werden können:

$$k_{max} = \frac{2 \cdot N_A \cdot k \cdot T}{3 \cdot \eta} \cdot \frac{(r_1 + r_2)^2}{r_1 \cdot r_2} \qquad (8a)$$

Hierin sind r die Radien der reagierenden Partikel, k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, N_A die Avogadrosche Zahl und η die Viskosität der Lösung. Gleichung (8a) ist nicht von der absoluten Grösse der Partikel, sondern nur vom Verhältnis r_1/r_2 abhängig. Setzt man r für den Phagen und den Weidel-Rezeptor 35 und 23.3 nm so erhält man bei 30 °C $k_{max} = 6.77 \cdot 10^9$ l/(Mol·sec). Aus zwei Gründen kann aber nicht jeder Zusammenstoss der beiden Reaktionspartner auch zu einer Reaktion führen: 1. müssen sich die Partikel in einer bestimmten Orientierung zueinander treffen (die Schwanzspitze von T5 macht nur etwa 1/200 der Phagenoberfläche aus und auch das Rezeptorpartikel besteht nur zum Teil aus TonA-Protein) und 2. kann der Zusammenstoss nur dann erfolgreich sein wenn die Energie der Partikel ausreicht um die Aktivierungsenergie der Reaktion aufzubringen. Gefunden wurde ein Wert von $6.05 \cdot 10^6$ l/(Mol·sec). Durch die Anreicherung des TonA-Proteins gegenüber dem Weidel-Rezeptor wurde die Grösse des aktiven Rezeptorpartikels drastisch verringert und damit dessen Diffusionsgeschwindigkeit er-

höht. Bei gleicher Wahrscheinlichkeit, dass ein erfolgter Zusammenstoss auch zur Reaktion führt, sollte sich die durch diese Grössenabnahme bedingte Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten nach der folgenden Formel berechnen lassen:

$$\frac{k_{max^1}}{k_{max^2}} = \frac{(r_1 + r_3)^2 \cdot r_2}{(r_1 + r_2)^2 \cdot r_3} \qquad (9)$$

mit r_1, dem Stokes-Radius des Phagen und r_2 und r_3, den Stokes-Radien der beiden Rezeptorpartikel. Nimmt man die hier gefundenen Werte 35 nm für den Phagen, 23.5 nm für den Weidel-Rezeptor und 4.6 nm für das angereicherte TonA so wäre eine grössenbedingte Zunahme der Geschwindigkeitskonstante k_1 von 2.34 zu erwarten. Gefunden wurden 10 °C: 2.81, 15 °C: 3.03, 20 °C: 3.10, 25 °C: 2.74, 30 °C: 2.46 und 35 °C: 2.55. Die Werte liegen durchweg etwas höher als der erwartete. Hierin schlägt sich wahrscheinlich die Zunahme des Anteils von TonA-Protein an der Rezeptoroberfläche nieder. Auf dem gleichen Effekt beruht die unter 3.2.4.2 gefundene Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten durch Zusatz von Triton zum Weidel-Rezeptor.

Da während der Rezeptorreinigung TonA-Protein spezifisch angereichert wurde und sich die Geschwindigkeitskonstante k_1 der ersten Wechselwirkung zwischen Phagen und Rezeptor entsprechend der Erwartung erhöht, kann davon ausgegangen werden, dass auch die der irreversiblen Inaktivierung vorgeschaltete, reversible Reaktion durch das TonA-Protein vermittelt wird. Die hier beschriebene reversible Stufe muss aber klar von der von Heller und Braun (43) gefundenen reversiblen Reaktion zwischen dem E. coli F-LPS und den Schwanzfasern ihres $T5^+$-Stammes unterschieden werden, da unser T5-Stamm keine Schwanzfasern trägt und deren $T5^+$ an das O-Antigen-freie E. coli B-LPS kaum adsorbiert wird. Die Reaktion zwischen den Schwanzfasern und dem LPS scheint ausschliesslich am O-Antigen zu erfolgen (44). Allerdings wurde auch bei uns ein Einfluss von LPS gefunden (3.4.3, S. 83), der aber in einer Erniedrigung der Inaktivierung resultiert und nicht, wie in (43), die Reaktion beschleunigt. Dies könnte auf Wechselwirkungen zwischen dem TonA-Protein und dem LPS, wie sie auch von Dubertret und Legault-Démare (26) und von

Graham und Stocker (35) aus anderen Experimenten geschlossen werden, zurückzuführen sein. Die gefundenen Werte der Geschwindigkeitskonstanten k_1 bis k_3 legen den Schluss nahe, dass, bei sonst identischem Verhalten, der Zusatz eines Überschusses an LPS einen Teil der Phagenbindestellen verdeckt (Erniedrigung von r_o).

Aus den in Tabelle 4 angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von T5-Phagen mit dem angereicherten TonA-Protein lassen sich die zeitabhängigen Konzentrationen aller Reaktionspartner anhand der Gleichungen (3a) bis (3d) (S. 74) berechnen. Diese Berechnung ist in Abbildung 28 dargestellt. Es sind die relativen Anteile an überlebenden Phagen (p/p_o, ausgezogene Kurven), an reversibel gebildetem Komplex ($<pr>/p_o$, punktiert, jeweils steil ansteigend) und an der Summe aller Produkte inklusive des irreversibel gebildeten Komplexes ($([pr]+...+[gr])/p_o$, punktiert, jeweils flach ansteigend) aufgetragen. Die ausgezogenen Kurven in Abbildung 28 entsprechen den Kurven der Messung aus den Abbildungen 22 und 25. Es fällt besonders die nur sehr langsame Bildung der Produkte auf. In diesem in vitro-System läuft die Reaktion bei 25 °C am vollständigsten ab (94 % Produkte nach 10 h), obwohl die Inaktivierung bei 35 °C zu dieser Zeit um fast eine Zehnerpotenz weiter fortgeschritten ist (Abbildung 25). Hierin spiegelt sich die bereits aus den Abbildungen 23 und 24 deutlich werdenden Diskontinuitäten in den Geschwindigkeitskonstanten k_2 und k_3. Bei der den in vivo-Verhältnissen näher stehenden Reaktion zwischen Weidel-Rezeptor und dem Phagen ist dies nicht der Fall (121). Dort steht einem stetigen Anstieg von k_1 mit steigender Temperatur ein stetiger Abfall von k_2 bei nahezu gleichbleibenden k_3 gegenüber, sodass die Reaktion mit steigender Temperatur immer vollständiger abläuft. In allen Experimenten zwischen T5 und seinem Rezeptor (Weidel-Rezeptor mit und ohne Triton aus (121) und angereichertes TonA mit Triton hier) findet sich auch das Verhalten wieder, welches beim Nachweis reversibler Reaktionen mit ganzen Bakterien die Elution der reversibel adsorbierten Phagen T1 und T2 durch Verdünnen bei niedriger Temperatur (18, 82) er-

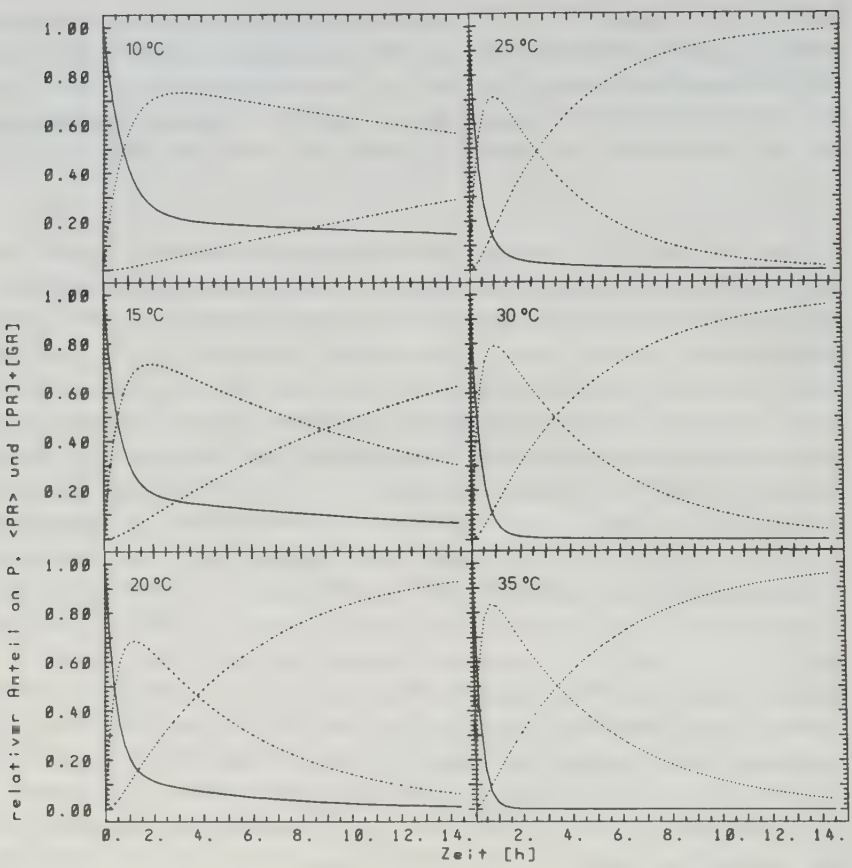

ABBILDUNG 28: Übersicht über die Konzentrationsänderungen der Reaktionspartner freier Phage P (ausgezogene Kurven), reversibel gebildeter Komplex <PR> (jeweils steil ansteigende Kurven, punktiert) und der Summe der irreversibel gebildeten Produkte [PR] + [GR] (jeweils flach ansteigende Kurven, punktiert), berechnet aus den Geschwindigkeitskonstanten der Tabelle 4 (Zeilen (1)) mit den Anfangskonzentrationen entsprechend Abbildung 22.

möglicht: die Gleichgewichtskonstante ist bei 10 °C sehr viel kleiner als bei 35 °C und k_2 sehr viel grösser als k_3. Deshalb lässt sich durch Verdünnen bei niedriger Temperatur das Gleichgewicht zu Gunsten der Ausgangsstoffe verschieben, wobei der Komplex <PR> bevorzugt zerfällt und nicht weiterreagiert. Bei

der reversiblen Wechselwirkung zwischen LPS und den T5-Schwanzfasern scheint die Gleichgewichtskonstante bei hohen Temperaturen niedriger zu sein, da Heller und Braun die Desorption bei 32 °C erreichen (43).

4.6 Thermodynamik der Reaktion zwischen T5-Phagen und deren Rezeptor

Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 29 die hier gefundenen thermodynamischen Grössen aus Tabelle 5 (S. 81) im Vergleich zu den für den Weidel-Rezeptor gefundenen Werten aus (121) nochmals grafisch dargestellt.
Geht man davon aus, dass beide hier beschriebenen Stufen der Reaktion durch das TonA-Protein vermittelt werden (s.o.), so bleibt die bereits beim Weidel-Rezeptor in Anwesenheit von Triton (121) gefundene Diskontinuität der thermodynamischen Daten unklar. Berücksichtigt man die Präparationsbedingungen des hier verwendeten, angereicherten TonA-Proteins, unter denen der Rezeptor über 100 h bei 40 °C gehalten wurde, so scheint es unwahrscheinlich, dass die Knicks in Abbildung 24 (S. 80) daherrühren, dass bei den kinetischen Messungen im Temperaturbereich grösser 25 °C ein, für die Reaktion essentieller Bestandteil aus dem Rezeptorkomplex herausgelöst wird. Es scheint sich hierbei vielmehr um ein systemimmanentes Artefakt zu handeln, welches auf den besonderen Eigenschaften des Triton-Wasser-Gemisches beruht. So ändern sich die Eigenschaften von wässrigen Triton-Lösungen nicht nur am sogenannten Cloud Point (S. 62), dessen Temperatur weit über dem hier untersuchten Bereich liegt, sondern es werden auch Effekte zwischen 15 und 40 °C beschrieben, die die Änderung der Hydratation der hydrophilen Polyoxyethylen-Reste der Triton-Mizellen betreffen. Mandal et al. (59) geben an, dass bei 15 °C die Polyoxyethylen-Ketten eine Länge von 1.7 nm haben, während sie, bedingt durch Hydratwasser-Verlust, bei 30 °C nur noch 0.7 nm lang sind. Bei Robson und Dennis (86) findet man, dass Triton auf Bio-Gel A-5m bei 20 °C als einzelner, scharfer Peak eluiert wird, während die Mizellen bei 40 °C

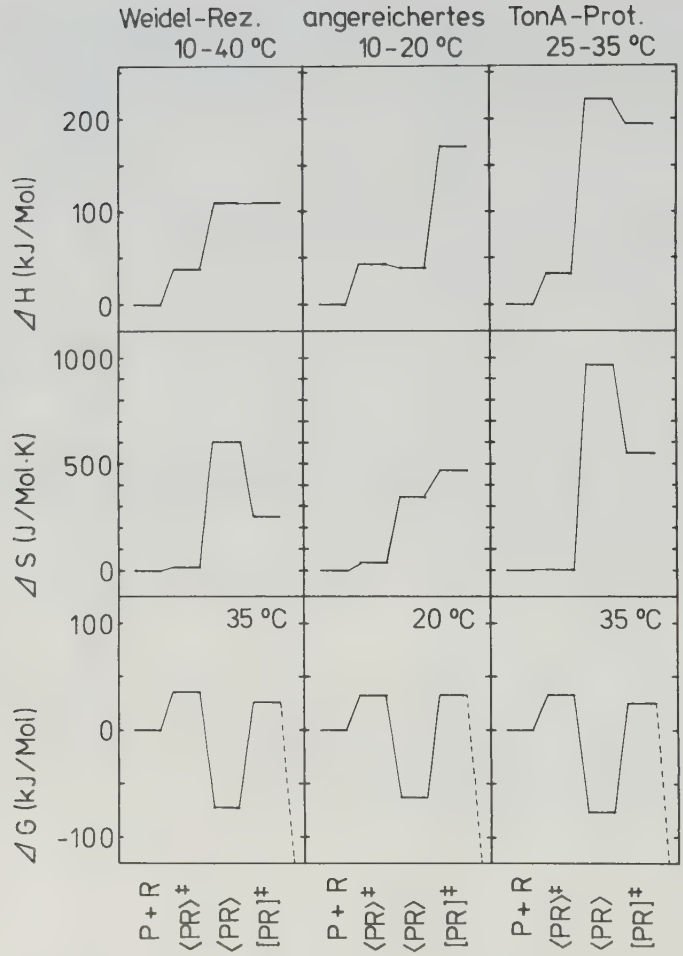

ABBILDUNG 29: Übersicht über die gefundenen thermodynamischen Daten im Vergleich zum Weidel-Rezeptor ohne Triton (linke Spalte) aus (121). Das Zeichen ‡ bezeichnet die aktivierten Übergangskomplexe.

heterogen und polydispers erscheinen. Dies könnte auch die Effekte aus Abbildung 21 (S. 72) erklären und würde implizieren, dass die Eigenschaften der hier untersuchten Partikel durch einen grossen Triton-Anteil bestimmt werden (vergleiche 4.4).
Vergleicht man die Kurven in Abbildung 29, so scheint der Zustand des angereicherten TonA-Proteins im oberen Temperaturbereich dem des Weidel-Rezeptors, zumindest qualitativ, näher zu kommen. Dasselbe gilt auch für den Weidel-Rezeptor in Anwesenheit von Triton (vergleiche Tabelle 5, (121)). Hierbei ist die mit $\Delta H_1^{\ddagger}$ und $\Delta S_1^{\ddagger}$ beschriebene primäre Wechselwirkung zwischen Phagen und TonA-Protein weitestgehend unabhängig von den Triton-bedingten Artefakten.

Bei dem hier gefundenen reversiblen Reaktionsschritt handelt es sich um eine endotherme Reaktion, deren Energiebedarf durch einen Entropiegewinn gedeckt wird. Ein, auch quantitativ, ähnliches Verhalten zeigt die, von der Gruppe um Lauffer untersuchte Polymerisation der Proteinuntereinheiten des Tabakmosaikvirus (99). Hierbei beruht der Entropiegewinn ΔS_{12} auf der Überführung der an den reagierenden Flächen geordnet vorliegenden Wassermoleküle in die ungeordnete Wasserphase. Die hierbei aufzuwendende Wärmemenge pro Mol freigesetzten Wassers beträgt, je nach Art des reagierenden Proteins, zwischen 1.2 und 5 kJ (99). Im Falle des TMV konnte die bei der Reaktion freiwerdende Menge Wasser bestimmt werden, sodass dort die Reaktion als eine reine hydrophobe Wechselwirkung beschrieben werden konnte. Die Grössenordnungen der thermodynamischen Konstanten allein lassen einen solchen Schluss jedoch nicht zu. Ein Indiz hierfür wäre die in (121) dargestellte Stabilität der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 zwischen pH 6 und pH 8. Die Empfindlichkeit der Kinetik gegenüber Harnstoff (13) und Natriumchlorid (Zarybnicky, unveröffentlicht) wiederum weist auf die Beteiligung ionischer Reaktionen hin.
Vom irreversiblen Teil der Reaktion ist keine entsprechende Beschreibung möglich, da die aus k_3 gewonnenen thermodynamischen Daten $\Delta H_3^{\ddagger}$ und $\Delta S_3^{\ddagger}$ lediglich die Ausbildung des aktivierten Komplexes $[PR]^{\ddagger}$ beschreiben. Die Abnahme der Entropie $\Delta S_3^{\ddagger}$ (Ta-

belle 5, S. 81) weist auf die für die Folgereaktion notwendige Ausbildung einer höher geordneten Struktur hin.

4.6.1 Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse

Da bei der fortschreitenden Reinigung eines Rezeptorproteins die chemische Umgebung desselben wesentlich verändert wird, können die gefundenen Ergebnisse auf Seiten der Vorgänge an der Membran nur sehr bedingt auf die in vivo-Verhältnisse übertragen werden. Dies gilt, wie die Tabellen 4 und 5 zeigen, insbesondere für die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten und für die aus ihnen abgeleiteten Aktivierungsenthalpien und -entropien. Die gefundenen Ergebnisse sind jedoch charakteristisch für den, während der Untersuchung konstant gehaltenen Reaktionspartner, den Phagen. Die Mehrstufigkeit der Reaktion wurde in allen untersuchten Fällen gefunden und sollte auch am TonA-Protein der Bakterienoberfläche auf ähnliche Weise, eventuell, je nach Bakterien- oder Phagenstamm, ergänzt durch vorgeschaltete Wechselwirkungen zwischen LPS und den Schwanzfasern (43), ablaufen.
Auffallend sind die praktisch immer identischen Gibbsschen freien Energien ΔG, sodass man geneigt wäre, auch diese für die in vivo-Verhältnisse zu übernehmen, bliebe nicht die Unsicherheit einer Auswirkung der möglichen Koppelung des TonA-Proteins an den energetisierten Zustand der inneren Bakterienmembran, wie sie von der Gruppe um Braun vorgeschlagen wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Nach bekannten Vorschriften wurde aus Escherichia coli B durch Extraktion mit verdünnter Natronlauge ein Membranbruchstück gewonnen, welches als Rezeptor für den Phagen T5 bekannt ist. Dieses Bruchstück wurde durch differentielle Zentrifugation und Gelchromatografie zu homogener Grösse gereinigt, und seine, für kinetische und thermodynamische Untersuchungen der Reaktion zwischen Phagen und Rezeptor wichtige Eigenschaften wurden untersucht. Es handelt sich um ein in verschiedenen Puffern stabiles Partikel mit einer Dichte von 1.15 g/cm^3 und einer Sedimentationskonstante von 181 S. Dies entspricht einer mittleren Molekülmasse von $47.5 \cdot 10^6$ D und einem hydrodynamische Durchmesser von 46.6 nm. Das Partikel besteht zu 44 % der Trockenmasse aus Protein, zu 35 % aus Lipopolysaccharid und zu 21 % aus Phospholipiden. Seine Zusammensetzung entspricht damit der äusseren Bakterienmembran. Mittels Pankreatin lassen sich über 90 % der Phospholipide abtrennen.

In Triton-haltigen Puffern werden die Partikel gespalten. Die hierdurch hervorgerufene Zunahme der Rezeptoraktivität beruht ausschliesslich auf der Abnahme der Grösse der Partikel und nicht auf der Freisetzung zusätzlicher Rezeptor-sites. Ungefähr 5 mg Triton/mg Protein reichen für eine weitgehende Spaltung aus. Die Spaltung ist stark von der Ionenstärke abhängig und durchläuft bei ungefähr 50 mMol/l Natriumchlorid ihr Optimum. Mit steigender Temperatur werden die Partikel besser gespalten. Nach dem Abkühlen bereits erhitzter Proben werden die grösseren Aggregate zurückgebildet. Auch bei erhöhter Temperatur kann nur ungefähr die Hälfte des an die Partikel gebundenen Lipopolysaccharids abgespalten werden.

Aus dem beschriebenen T5-Rezeptor wurde durch wiederholte DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatografie bei 40 °C eine angereicherte, hochaktive TonA-Proteinpräparation gewonnen. Unterhalb 25 °C wurden die aktiven Partikel dieser Präparation in sehr verdünnter, Triton-haltiger Lösung von einer Ultrogel AcA 34-Säule als sehr scharfer Peak entsprechend einer Molekularmasse von 230 000 D (Stokes-Radius 4.6 nm) eluiert. Oberhalb

von 25 °C wird das Elutionsmuster zusehends heterogener; es kommt zu Wechselwirkungen mit der Gelmatrix.
Die Kinetik der Reaktion zwischen diesen TonA-Protein-angereicherten Rezeptorpartikeln und dem Phagen T5 zwischen 10 und 35 °C wurde bis 10 h verfolgt und thermodynamisch ausgewertet. Die erhaltenen Kurven lassen sich als Ergebnis zweier aufeinanderfolgender Reaktionsschritte, von denen der erste reversibel und der zweite irreversibel ist, interpretieren, wie dies bereits für die Inaktivierung von T5-Phagen durch die oben beschriebenen, grossen Rezeptorpartikel bekannt ist. Die Geschwindigkeitskonstanten des reversiblen und des irreversiblen Reaktionsschrittes wurden für alle gemessenen Temperaturen aus den Inaktivierungskurven berechnet. Aus deren Temperaturabhängigkeit wurden die Aktivierungsenthalpien, -entropien und die Gibbsschen freien Energien der jeweiligen Reaktionsschritte bestimmt. Beim reversiblen Reaktionsschritt handelt es sich um eine endotherme, entropiegetriebene Reaktion. Die thermodynamischen Daten sind nicht über den ganzen, gemessenen Temperaturbereich konstant, sondern knicken genau dort ab, wo auf der AcA 34-Säule das Elutionsmuster inhomogen zu werden beginnt. Die Diskontinuität scheint auf einem, im Triton-Wasser-System bedingten, Artefakt zu beruhen. Hiervon ist die Geschwindigkeitskonstante der ersten Wechselwirkung zwischen Phage und Rezeptor, welche diffusionskontrolliert erfolgt, kaum betroffen. Sowohl für den reversiblen als auch für den irreversiblen Reaktionsschritt scheint das tonA-Genprodukt verantwortlich zu sein.
Der Zusatz eines Überschusses an Lipopolysaccharid zu diesem System scheint die Zahl der aktiven Partikel zu verringern, während die Kinetik sonst unverändert bleibt.

4. LITERATUR

1. Ackers, G.K.:
'A new calibration procedure for gel filtration columns'
J. Biol. Chem. 242 (1967) 3237-3238.

2. Ackers, G.K.:
'Analytical gel chromatography of proteins'
Advan. Protein Chem. 24 (1970) 343-446.

3. Bayer, M.E.:
'Role of adhesion zones in bacterial cell surface function and biogenesis'
in 'Membrane Biogenesis'
(A. Tzagoloff, Ed.) 1975, 393-427,
Plenum Publishing Corp., New York.

4. 'Bio-Rad Protein Assay'
Firmenschrift der Firma Bio-Rad Laboratories, 1979, S. 4.

5. Blaich, R.:
'Analytische Elektrophoreseverfahren
Praktikum der Proteinuntersuchung in Elektrophorese, Elektrofokussierung und Isotachophorese'
G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1978, S. 53.

6. Bradley, D.E.:
'Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins'
Bacteriol. Rev. 31 (1967) 230-314.

7. Braun, V.:
'Structure function relationships of the Gram-negative bacterial cell envelope'
Symposia of the Society for General Microbiology
28 (1978) 111-138.

8. Braun, V., J. Frenz, K. Hantke und K. Schaller:
'Penetration of colicin M into cells of Escherichia coli'
J. Bacteriol. 142 (1980) 162-168.

9. Braun, V. und K. Hantke:
'Bacterial cell surface receptors'
in 'Organization of Procaryotic Cell Membranes'
(B.K. Ghosh, Ed.) Band II, S. 1-73,
CRC Press, Boca Raton (1981).

10. Braun, V. und K. Hantke:
'Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems'
in 'Receptors and Recognition' Series B, Vol. 3,
'Microbial Interactions' (J.L. Reissig, Ed.)
Chapman and Hall, London, (1977) 101-130.

11. Braun, V. und H. Wolff:
'Characterization of the receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of E. coli B'
FEBS Letters 34 (1973) 77-80.

12. Braun, V. und K. Rehn:
'Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the E. coli cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure'
Europ. J. Biochem. 10 (1969) 426-438.

13. Braun, V., K. Schaller und H. Wolff:
'A common receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of Escherichia coli B'
Biochim. Biophys. Acta 323 (1973) 87-97.

14. Brown, K.M. und J.E. Dennis:
'Derivative free analogues of the Levenberg-Marquardt and Gauss algorithms for nonlinear least squares approximation'
Num. Math. 18 (1972) 289-297.

15. Brusdeilins, M.:
'Chemische und biologische Untersuchung des Lipopolysaccharids von Escherichia coli B unter besonderer Berücksichtigung der Struktur des Core-Oligosaccharids'
Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1979.

16. Burnell, E., L. van Alphen, A. Verkleij und B. de Kruijff:
'^{31}P-Nuclear magnetic resonance and freeze-fracture electron microscopy studies on Escherichia coli I. Cytoplasmic membrane and total phospholipids'
Biochim. Biophys. Acta 597 (1980) 492-501.

17. Burnell, E., L. van Alphen, A. Verkleij, B. de Kruijff und B. Lugtenberg:
'^{31}P Nuclear magnetic resonance and freeze-fracture electron microscopy studies on Escherichia coli III. The outer membrane'
Biochim. Biophys. Acta 597 (1980) 518-532.

18. Christensen, J.R.:
'The kinetics of reversible and irreversible attachment of bacteriophage T1'
Virology 26 (1965) 727-737.

19. Clarke, S.:
'The size and deterdent-binding of membrane proteins'
J. Biol. Chem. 250 (1975) 5459-5469.

20. Cotman, C.W., W. Levy, G. Banker und D. Taylor:
'An ultrastructural and chemical analysis of the effect of Triton X-100 on synaptic plasma membranes'
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 406-418.

21. Datta, D.B., B. Arden und U. Henning:
'Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membranes as bacteriophage receptors'
J. Bacteriol. 131 (1977) 821-829.

22. Davies, D.R., E.A. Padlan und D.M. Segal:
'Three-dimensional structure of immunglobulins'
Ann. Rev. Biochem. 44 (1975) 639-695.

23. Dawes, J.:
'Characterization of the bacteriophage T4 receptor site'
Nature 256 (1975) 127-128.

24. DePamphilis, M.L.:
'Dissociation and reassembly of Escherichia coli outer membrane and of lipopolysaccharide, and their reassembly onto flagellar basal bodies'
J. Bacteriol. 105 (1971) 1184-1199.

25. DiRienzo, J.M., K. Nakamura und M. Inouye:
'The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly and function'
Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 481-532.

26. Dubertret, C. und J. Legault-Démare:
'Role of the membrane environment of the tonA protein in bacteriophage T5 adsorption'
FEMS Microbiol. Letters 4 (1978) 63-66.

27. Duckworth, D.H., E.M. Bevers, A.J. Verkleij, J.A.F. op den Kamp und L.L.M. van Deenen:
'Action of phospholipase A_2 and phospholipase C on Escherichia coli'
Arch. Biochem. Biophys. 165 (1974) 379-387.

28. Eyring, H.:
'The activated complex and the absolute rate of chemical reactions'
Chem. Rev. 17 (1935) 65-77.

29. Frank, H., M.L. Zarnitz und W. Weidel:
'Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T5 VII. Mitt.: Darstellung und Längenbestimmung der aus T5/R5-Komplexen freigesetzten DNS'
Z. Naturforschg. 18b (1963) 281-284.

30. Furukawa, H., H. Yamada und S. Mizushima:
'Interaction of bacteriophage T4 with reconstituted cell envelopes of Escherichia coli K-12'
J. Bacteriol. 140 (1979) 1071-1080.

31. Gaál, D. und L. Holczinger:
'Effects of detergents and sucrose derivates on the modified protein determination of Lowry'
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 10 (1975) 201-206.

32. Galanos, C., O. Lüderitz und O. Westphal:
'A new method for the extraction of R lipopolysaccharides'
Europ. J. Biochem. 9 (1969) 245-249.

33. Garewal, H.S.:
'A procedure for the estimation of microgram quantities of Triton X-100'
Analyt. Biochem. 54 (1973) 319-324.

34. Gmeiner, J. und S. Schlecht:
'Molecular composition of the outer membrane of Escherichia coli and the importance of protein-lipopolysaccharide interactions'
Arch. Microbiol. 127 (1980) 81-86.

35. Graham, A.C. und B.A.D. Stocker:
'Genetics of sensitivity of Salmonella species to colicin M and bacteriophages T5, T1 and ES18'
J. Bacteriol. 130 (1977) 1214-1223.

36. Gundlach, G. und A. Dilmann:
'Das neue SI-Einheitensystem'
Hoppe-Seyler's Z. für Physiol. Chem. 358 (1977) X-XIV.

37. Gutfreund, H.:
'Enzymes: Physical Principles'
Wiley Interscience, London, 1971, S. 159.

38. Hancock, R.E.W. und V. Braun:
'Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and PHI80 to Escherichia coli K-12'
J. Bacteriol. 125 (1976) 409-415.

39. Hantke, K. und V. Braun:
'Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in Escherichia coli'
J. Bacteriol. 135 (1980) 190-197.

40. Hartree, E.F.:
'Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response'
Analyt. Biochem. 48 (1972) 422-427.

41. Helenius, A. und K. Simons:
'Solubilization of membranes by detergents'
Biochim. Biophys. Acta 415 (1975) 29-79.

42. Helenius, A. und H. Söderlund:
'Stepwise dissociation of the Semlicki forest virus membrane with Triton X-100'
Biochim. Biophys. Acta 307 (1973) 287-300.

43. Heller, K. und V. Braun:
'Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to Escherichia coli F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding'
J. Bacteriol. 139 (1979) 32-38.

44. Heller, K. und V. Braun:
'Polymannose O-antigens of Escherichia coli, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage $T5^+$ via L-shaped tail fibers'
J. Virology 41 (1982) 222-227.

45. Henning, U. und K. Jann:
'Two component nature of bacteriophage T4 receptor activity in Escherichia coli K-12'
J. Bacteriol. 137 (1979) 664-666.

46. Ito, A. und R. Sato:
'Purification by means of detergents and properties of cytochome b_5 from liver microsomes'
J. Biol. Chem. 243 (1968) 4922-4930.

47. Jahnke-Emde-Lösch:
'Tafeln höherer Funktionen'
6. Auflage, neubearb. v. F. Lösch
Teubner-Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1960, S.31.

48. Karkhanis, Y.D., J.Y. Zeltner, J.J. Jackson und D.J. Carlo:
'A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccaride of Gram-negative bacteria'
Analyt. Biochem. 85 (1978) 595-601.

49. Kirkpatrick, F.H., S.E. Gordesky und G.V. Marinetti:
'Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membrane by detergents'
Biochim. Biophys. Acta 345 (1974) 154-161.

50. Lanius, P.:
'Isolierung und Charakterisierung des multifunktionellen Rezeptors für die Phagen T5, T1, PHI80, das Colicin M und den Eisenkomplex Ferrichrom von Escherichia coli'
Dissertation, Eberhard Karls Universität, Tübingen, 1979.

51. Leive, L.:
'Domaines involving nonrandom distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of Escherichia coli'
Proc. Natl. Acad. Sci. 74 (1968) 5065-5068.

52. Leive, L., V.K. Shovlin und S.E. Mergenhagen:
'Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharide released from Escherichia coli by ethylenediamine tetraacetate'
J. Biol. Chem. 243 (1968) 6384-6391.

53. Lowey, S., H.S. Slayter, A.G. Weeds und H. Baker:
'Substructure of the myosin molecule
I. Subfragment of myosin by enzymic degradation'
J. Mol. Biol. 42 (1969) 1-29.

54. Lowry, O.H., N.R. Roberts, K.Y. Leiner, M.L. Wu
und A.L. Farr:
'Histochemistry of brain. I'
J. Biol. Chem. 207 (1954) 1-16.

55. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall:
'Protein measurement with the Folin phenol reagent'
J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.

56. Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hoek
und L. van Alphen:
'Electrophoretic resolution of the major outer membrane
protein of Escherichia coli K12 into four bands'
FEBS Letters 58 (1975) 254-258.

57. Maclay, W.N.:
'Factors affecting the solubility of nonionic emulsifiers'
J. Colloid. Sci. 11 (1956) 272-285.

58. Makino, S.:
'Interaction of proteins with amphiphilic substances'
Advances in Biophysics (Masao Kotani ed.)
Vol. 12 (1979) 131-184
Japan Scientific Societies Press
University Park Press.

59. Mandal, A.B., S. Ray, A.M. Biswas und S.P. Moulik:
'Physicochemical studies on the characterization of Triton
X-100 micelles in an aqueous environment and in the
presence of additives'
J. Phys. Chem. 84 (1980) 856-859.

60. McFarland, B.H. und G. Inesi:
'Solubilization of sarcoplasmic reticulum with
Triton X-100'
Arch. Biochim. Biophys. 145 (1971) 456-464.

61. 'Enzyme für Pharmazie und Lebensmittel'
Firmenschrift der Firma E. Merck, Darmstadt.

62. Miller, D.M.:
'Total solubilization of erythrocyte membranes by nonionic
detergents'
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 (1970) 716-722.

63. Mühlradt, P.F.:
'Topography of outer membrane assembly in Salmonella'
J. Supramol. Struct. 51 (1976) 103-108.

64. Mühlradt, P.F. und J.R. Golecki:
'Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of Salmonella typhimurium'
Eur. J. Biochem. 51 (1975) 343-352.

65. Mutoh, N., H. Furukawa und S. Mizushima:
'Role of lipopolysaccharide and outer membrane protein of Escherichia coli K-12 in the receptor activity for bacteriophage T4'
J. Bacteriol. 136 (1978) 693-699.

66. Nakae, T., J. Ishii und M. Tokunaga:
'Subunit structure of functional porin oligomers that form permeability channels in the outer membrane of Escherichia coli'
J. Biol. Chem. 254 (1979) 1457-1461.

67. Nakae, R. und H. Nikaido:
'Outer membrane as a diffusion barrier in Salmonella typhimurium. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer'
J. Biol. Chem. 250 (1975) 7359-7365.

68. Nakagawa, T.:
'Solubilization'
in 'Nonionic Surfactants' (M.J. Schick, ed.),
Chapter 17, S. 571 ff
Surfactant Science Series, Volume 1
Marcel Dekker, New York, 1966.

69. Nakayama, H., T. Mitsui, M. Nishihara und M. Kito:
'Relation between growth temperature of E. coli and phase transition temperature of its cytoplasmic and outer membranes'
Biochim. Biophys. Acta 601 (1980) 1-10.

70. Ne'eman, Z., I. Kahane und S. Razin:
'Characterization of the mycoplasma membrane proteins II. Solubilization and enzymic activities of Acholeplasma laidlawii membrane proteins'
Biochim. Biophys. Acta 249 (1971) 169-176.

71. Nikaido, H., Y. Takeuchi, S.I. Ohnishi und T. Nakae:
'Outer membrane of Salmonella typhimurium Electron spin resonance studies'
Biochim. Biophys. Acta 465 (1977) 152-164.

72. Noelken, M.E., C.A. Nelson, C.E. Buckley, III und C. Tanford:
'Gross conformation of rabbit 7 S gamma-immunglobulins and its papain-cleaved fragments'
J. Biol. Chem. 240 (1965) 218-224.

73. Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi und J. Carson:
'Mechanism of assembly of the outer membrane of Salmonella typhimurium. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane'
J. Biol. Chem. 247 (1972) 3962-3972.

74. Osborn, M.J. und C.P. Wu:
'Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria'
Ann. Rev. Microbiol. 34 (1980) 369-422.

75. Paradies, H.H.:
'Shape and size of a nonionic surfactant micelle. Triton X-100 in aqueous solution'
J. Phys. Chem. 84 (1980) 599-607.

76. Peterson, G.L.:
'Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall'
Analyt. Biochem. 100 (1979) 201-220.

77. 'Gel filtration. Theory and practice'
Firmenschrift der Pharmacia Fine Chemicals
Ausgabe April 1979, S. 27.

78. Plastow, G.S. und I.B. Holland:
'Identification of an Escherichia coli inner membrane polypeptide specified by a lambda-tonB transducing bacteriophage'
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 (1979) 1007-1014.

79. Plastow, G.S., J.M. Pratt und I.B. Holland:
'The ferrichrome receptor protein (tonA) of Escherichia coli is synthesised as a precursor in vitro'
FEBS Lett. 131 (1981) 262-264.

80. Pober, J.S. und L. Stryer:
'Light dissociates enzymatically cleaved rhodopsin into two different fragments'
J. Mol. Biol. 95 (1975) 477-481.

81. Prehm, P., S. Stirm, B. Jann und K. Jann:
'Cell-wall lipopolysaccharide from Escherichia coli B'
Europ. J. Biochem. 56 (1975) 41-55.

82. Puck, T.T., A. Garen und J. Cline:
'The mechanism of virus attachment to host cells I. The role of ions in the primary reaction'
J. Exp. Med. 93 (1950) 65-88.

83. Reich, M. und V. Zarybnicky:
'Dependence of the tritium counting efficiency on the ionic strength of aqueous samples in a Triton X-100/toluene scintillation system'
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 31 (1980) 159-161.

84. Reynolds, J.A.:
'Solubilization and characterization of membrane proteins' in 'Membrane receptors
Methods for purification and characterization'
(S. Jacobs and P. Cuatrecasas, eds.)
Receptors and Recognition, Series B, Volume 11, 33-59
Chapman and Hall, London and New York, 1981.

85. Robinson, N.C. und C. Tanford:
'The binding of desoxycholate, Triton X-100, SDS and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b_5'
Biochemistry 14 (1975) 269-378.

86. Robson, R.J. und E.A. Dennis:
'Mixed micelles of sphingomyelin and phosphatidylcholine with nonionic surfactants. Effect of temperatur on surfactant polydispersity'
Biochim. Biophys. Acta 573 (1979) 489-500.

87. Rosenbusch, J.P.:
'Characterization of the major envelope protein from Escherichia coli. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecylsulfate binding'
J. Biol. Chem. 249 (1974) 8019-8029.

88. Sartorius Membranfilter
'Filterprogramm'
Firmenschrift, Ausgabe Juli 1975.

89. Schnaitman, C.A.:
'Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100'
J. Bacteriol. 108 (1971) 545-552.

90. Schnaitman, C.A.:
'Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of Escherichia coli'
J. Bacteriol. 108 (1971) 553-563.

91. Schwartz, M.:
'Reversible interaction between coliphage lambda and its receptor protein'
J. Mol. Biol. 99 (1975) 185-201.

92. Schweizer, M., I. Hindenach, W. Garten und U. Henning:
'Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Interaction of Protein II* with LPS'
Eur. J. Biochem. 82 (1978) 211-217.

93. Segrest, J.P., T. Gulik-Krzywicki und C. Sardet:
'Association of the membrane-penetrating fragment of the human erythrocyte MN-Glycoprotein with phospholipid bilayers. I. Formation of freeze-etch intramembranous particles'
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71 (1974) 3294-3298.

94. Skurray, R.A., R.E.W. Hancock und P. Reeves:
'Con⁻-mutants: class of mutants in Escherichia coli K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage'
J. Bacteriol. 119 (1974) 726-735.

95. Spatz, L. und P. Strittmatter:
'A form of cytochrome b_5 that contains additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues'
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68 (1971) 1042-1046.

96. Spatz, L. und P. Strittmatter:
'A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b_5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment'
J. Biol. Chem. 248 (1973) 793-799.

97. Staples, E.J. und G.J.T. Tiddy:
'Nuclear magnetic-resonance technique to distinguish between micelle size changes and secondary aggregation in anionic and nonionic surfactant solutions'
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I 74 (1978) 2530-2541.

98. Staron, K. und Z. Kaniuga:
'Involvement of NADH-cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 complex in microsomal cytochrome C reduktase activity. Resolution of complex by Triton X-100'
Acta Biochim. Polon. 21 (1974) 55-60.

99. Stauffer, H., S. Srinivasan und M.A. Lauffer:
'Calorimetric studies on polymerization-depolymerization of tobacco mosaic virus protein'
Biochemistry 9 (1970) 193-200.

100. Stegemann, H.:
'SDS-Gel-electrophoresis in polyacrylamide, merits and limits'
in 'Electrokinetic Separation Methods' (Appendix)
(P.G. Righetti, C.D. van Oss und J.W. Vanderhoff eds.)
Elsevier/ North Holland Biomedical Press, 1979, 313-336.

101. Stent, G.S. und E.L. Wollman:
'On the two-step nature of bacteriophage adsorption'
Biochim. Biophys. Acta 8 (1952) 260-269.

102. Studier, F.W.:
'Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels'
J. Mol. Biol. 79 (1973) 237-248.

103. Sukow, W.W., H.E. Sandberg, E.A. Lewis, D.J. Eatough und L.D. Hansen:
'Binding of the Triton X series of nonionic surfactants to bovine serum albumine'
Biochemistry 19 (1980) 912-917.

104. Takeda, Y., A. Nishimura, Y. Nishimura, M. Yamada, S. Yasuda, H. Suzuki und Y. Hirota:
'Synthetic ColE1 plasmids carrying genes for penicillin -binding proteins of Escherichia coli'
Plasmid 6 (1981) 86-98.

105. Tanford, C., Y. Nozaki, J.A. Reynolds und S. Makino:
'Molecular characterization of proteins in detergent solutions'
Biochemistry 13 (1974) 2369-2376.

106. Tanford, C. und J.A. Reynolds:
'Characterization of membrane proteins in detergent solutions'
Biochim. Biophys. Acta 457 (1976) 133-170.

107. Thilo, L. und P. Overath:
'Randomization of membrane lipids in relation to transport system assembly in Escherichia coli'
Biochemistry 15 (1976) 328-334.

108. Udenfried, S., S. Stein, P. Boehlen, W. Dairman, W. Leimgruber und M. Weigele:
'Flourescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, and primary amines in the picomole range'
Science 178 (1972) 871-872.

109. Van Alphen, L., B. Lugtenberg, R. van Boxtel und K. Verhoef:
'Architecture of the outer membrane of Escherichia coli K12. I. Action of phospholipases A_2 and C on wild type strains and outer membrane mutants'
Biochim. Biophys. Acta 466 (1977) 257-268.

110. Visser, L., N.C. Robinson und C. Tanford:
'The two-domain structure of cytochrome b_5 in deoxycholate solution'
Biochemistry 14 (1975) 1194-1199.

111. Weidel, W.:
'Bacterial viruses (With particular reference to adsorption/penetration)'
Ann. Rev. Microbiol. 12 (1958) 27-48.

112. Weidel, W. und E. Kellenberger:
'The E. coli B-Receptor for the phage T5 II. Electron microscopic studies'
Biochim. Biophys. Acta 17 (1955) 1-9.

113. Weidel, W., G. Koch und K. Bobosch:
'Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T5 1. Extraktion und Reindarstellung aus E. coli B. Physikalische, chemische und funktionelle Charakterisierung'
Z. Naturforschg. 9b (1954) 573-579.

114. Winzler, R.J., E.D. Harris, D.J. Peakas, C.A. Johnson und P. Weber:
'Studies of glycopeptides released by trypsin from intact human erythrocytes'
Biochemistry 6 (1967) 2195-2202.

115. Wong, M., M.E. Bayer und S. Litwin:
'Virus-cell interaction: Prediction of the time course of observable effects from virus interaction at cell injection sites, and mechanisms leading to attachment'
FEBS-Letters 95 (1978) 26-30.

116. Yamada, H. und S. Mizushima:
'Interaction between major outer membrane protein (O-8) and lipopolysaccharide in Escherichia coli K12'
Eur. J. Biochem. 103 (1980) 209-218.

117. Zarnitz, M.L. und W. Weidel:
'Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T5
VI. Mitt.: Die Thermodynamik der Kontaktbildung zwischen Phage und Rezeptor sowie deren mögliche Bedeutung als morphogenetischer Modellmechanismus'
Z. Naturforschg. 18b (1963) 276-280.

118. Zarybnicky, V. und M. Reich:
'Tritium counting effficiencies and time stabilities with different amounts of aqueous salt solutions in a Triton X-100/toluene scintillant'
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 30 (1979) 729-737.

119. Zarybnicky, V. und M. Reich:
'Liquid scintillation counting of aqueous suspensions of microbiological specimens in a Triton X-100/ toluene scintillant'
Analyt. Biochem. 101 (1980) 476-482.

120. Zarybnicky, V., M. Reich und G. Wolf:
'A mathematical model for the reversible two-step interaction between the T5 phage and its receptor in vitro'
FEMS Microbiology Letters 7 (1980) 29-33.

121. Zarybnicky, V. , M. Brusdeilins und M. Reich:
'Thermodynamic and kinetic studies of the interaction between T5-phages and their receptor, isolated from Escherichia coli B, in the absence and presence of Triton X-100'
Biophys. J. 35 (1981) 615-636.

122. Zarybnicky, V., A. Zarybnicka und H. Frank:
'Infection process of T5 Phages
I. Ejection of T5 DNA on isolated T5 Rezeptors'
Virology 54 (1973) 318-329.

7. LEBENSLAUF

Name:	Brusdeilins, Martin
Geburtstag und -ort:	26. 3. 1952, Hamburg-Blankenese
Eltern:	Heinz Brusdeilins und Ilse Brusdeilins (geb. Mühlfenzl)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbesuch:	1959 - 1963 Grund- und Hauptschule Hamburg-Barmbek 1963 - 1964 Gymnasium für Jungen Hamburg, Uhlenhorst-Barmbek 1964 - 1971 Albert-Einstein Gymnasium Böblingen
Studium:	WS 71/72 - WS 72/73 Diplom-Chemie (Universität Stuttgart) SS 73 - SS 79 Diplom-Biochemie (Eberhard-Karls-Universität Tübingen)
Diplom:	mündliche Prüfungen in den Fächern Biochemie, organische Chemie und Mikrobiologie im Herbst 1978.
Diplomarbeit:	WS 78/79 - SS 79 am MPI für Biologie, Abt. Beermann, Labor Zarybnicky: 'Chemische und biologische Untersuchung des Lipopolysaccharids von Escherichia coli B unter besonderer Berücksichtigung der Struktur des Core-Oligosaccharids'
4. Juli 1975:	Eheschliessung mit Karin Pause aus Nagold
7. Mai 1979:	Geburt unserer Tochter Sabine.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 1979 bis März 1982 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen, Abteilung Beermann, unter Anleitung von Herrn Dr. CSc V. Zarybnicky angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, W. Eisenmenger, E. Fluck, M. Hanack, H. Krebs,
H. Krüger, E. Lindner, E. Mauser, E. Müller, H. Preuss,
W. Rüdorff, F.F. Seelig, W. Voelter, W. Zeil
(Chemie und Physik)

V. Braun, K.G. Grell, J. Guglielmi, U. Henning, D. Mecke,
H. Metzner, K. Mörike, P. Overath, H. Probst, B. Schwemmle,
W. Seyffert, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner, V. Zarybnicky
(Biologie und Biochemie)

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69

Sprint-Druck GmbH
7000 Stuttgart 30
Wiener Str. 117
Tel. 0711/81 26 69